

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
ARENGUBIOLOOGIA ÕPPETOOL

Victor Blokhin

SR-A retseptorite regulatsioon plasmiidse DNA transpordil PepFect ja NickFect
tüüpi transportpeptiididega

Magistritöö

Juhendajad:

prof. Margus Pooga, Ph.D

Helerin Margus, Ph.D

TARTU 2016

SISUKORD

SISUKORD	2
INFOLEHT.....	4
LÜHENDID	5
SISSEJUHATUS	7
1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE	8
1.1 Rakku sisenevad peptiidid	8
1.2 RSP-de kasutamine transportvektorina	8
1.3 Endotsütoos	9
1.4 RSP-de kasutamine <i>in vivo</i>	11
1.5 PepFect peptiidide perekond	12
1.6 PepFect14 ja tema kompleksid nukleiinhapetega.....	14
1.7 NickFect peptiidide perekond.....	15
1.8 NickFect51 ja tema kompleksid	15
1.9 PF14 ja NF51 komplekside internaliseerumine.....	16
1.10 Püüdurretseptorid	17
1.11 Klass A püüdurretseptorid	17
2. EKSPERIMENTAALNE OSA	20
2.1 Töö eesmärgid	20
2.2 Materjal ja meetodika.....	20
2.2.1 Kasutatud rakuliinid	20
2.2.2 Kasutatud peptiidid ja nukleiinhapped	20
2.2.3 Kasutatud antikehad	21
2.2.4 Kasutatud endotsütoosi inhibiitorid.....	21
2.2.5 Plasmidi transformeerimine	21
2.2.6 Plasmidse DNA paljundamine ja puhastamine	21
2.2.7 Rakku siseneva peptiidi ja plasmidse DNA komplekside valmistamine	22
2.2.8 Rakkude töötlemine RSP-pDNA kompleksidega	22
2.2.9 Püüdurretseptorite detekteerimine	22
2.2.10. Püüdurretseptorite rakku pinnale indutseerimine ja rakkude transfekteeerimine	23
2.2.10a Läbivoolu tsütomeetria (FACS) proovide valmistamine ja analüüsimine.....	23
2.2.11 Endotsütoosi radade analüüsimine	24
2.3 Tulemused	25

2.3.1 SR-A retseptorite detekteerimine HeLa rakkude pinnal pärast inkubeerimist RSP-pDNA kompleksidega	25
2.3.2 SR-A retseptorite detekteerimine A549 rakkude pinnal pärast inkubeerimist RSP-pDNA nanokompleksidega	27
2.3.3 PF14-pDNA komplekside endotsütoosimehhanismide analüüs HeLa rakkudes	29
2.3.4 PF14-pDNA komplekside endotsütoosimehhanismide analüüs A549 rakkudes	30
2.3.5 SR-A retseptorite plasmamembraani suunamise indutseerimine RSP-dega suurendamaks komplekside transfektsiooni efektiivsust HeLa rakkudes	31
2.3.6 SR-A retseptorite plasmamembraani suunamise indutseerimine RSP-dega suurendamaks komplekside transfektsiooni efektiivsust A549 rakkudes	33
2.4 Arutelu	35
KOKKUVÕTE	38
SUMMARY	40
TÄNUAVALDUSED	42
KASUTATUD KIRJANDUS	43
LISAD	48
LIHTLITSENS	51

INFOLEHT

Rakku sisenevad peptiidid (RSP) on kõrge potentsiaaliga transportvektorid, mida saab rakendada bioaktiivsete molekulide transportimiseks *in vitro* ja *in vivo*. Antud töö käsitleb rakku sisenevate peptiidide PepFect14 ja NicFect51 kasutamist plasmiidse DNA (pDNA) transportimiseks rakku kasutades mittekovalentset nanokomplekside moodustamise strateegiat. Lisaks uuriti klass A püüdurretseptorite (SR-A) eksponeerimist HeLa ja A549 rakkude pinnale RSP-pDNA komplekside toimel. Töös näidati, et RSP-pDNA nanokompleksid sisenevad efektiivselt HeLa ja A549 rakkudesse ning selle jaoks kasutatakse erinevaid endotsütoosi radasid ja SR-A3 ja SR-A5 retseptorid.

Märksõnad: rakku sisenev peptiid, PepFect14, NicFect51, klass A püüdurretseptor, makropinotsütoos, klatriin-sõltuv endotsütoos, kaveoliin-sõltuv endotsütoos.

Cell-penetrating peptides (CPP) are promising delivery vectors which can transport various types of macromolecules across the plasma membrane into the interior of cells. PepFect14 and NicFect51 are second generation CPPs that are able to bind non-covalently nucleic acids such as plasmid DNA, siRNA and SCO. Internalization of such complexes is mediated by class A scavenger receptors (SR-A) on the cell surface. In this work the recruitment of SR-A receptors to the plasma membrane by CPP-pDNA complexes was analyzed. In addition, the endocytic pathways involved in the delivery of the nanocomplexes into HeLa and A549 cells were examined.

Key words: cell-penetrating peptide, PepFect14, NicFect51, class A scavenger receptors, macropinocytosis, clathrin-mediated endocytosis, caveolin-mediated endocytosis.

LÜHENDID

A20 – hiire b-lümfoomi rakuliin

A549 – inimese bronhalveolaarse epiteeli adenokartsinoomi rakuliin

AMO – RNA vastane oligonukleotiid

AP2 – adapter valk 2

AP180 – adapter valk 180

BER – bronhoalveolaarse epiteeli rakuliin

CP – kloorpromasiin

CHO – hiina hamstri munasarja rakuliin

CQ – klorokviin

DMD – Duchenne lihasdüstroofia

EGFP – i.k. *enhanced green fluorescent protein*

EIPA – 5-(N-etüül-N-isopropüül)-amiloriid

FACS – läbivoolu tsütomeetria

FBS – veiseloote seerum

IMDM – *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

Jurkat – inimese T lümfotsüütide immortaliseeritud rakuliin

KKV – klatriiniga kaetud vesiikul

LF2000 – *Lipofectamine 2000*

MEF – hiire embrüonaalsed fibroblastid

NF51 – NickFeck51

NFDM – rasvavaba lõssipulber (*non fat dry milk*)

Nyst – nüstatiin

ON – oligonukleotiid

PF14 – PepFect14

PNA – peptiidne nukleiinhape

QMCF technology – *mammalian protein production system*

QN – trifluorometüülkinoliini jääk

RSP – rakku sisenev peptiid

SKO – splaissingut korregeeriv oligonukleotiid

SR-A3 – klass A püüdurreseptor 3

SR-A5 – klass A püüdurreseptor 5

TEM – transmissioon elektron mikroskoopia

TP10 – transportaan 10

U2SO – inimese osteosarkoomi rakuliin

U87 – inimese glioblastoomi rakuliin

SISSEJUHATUS

Nukleiinhapped nagu näiteks plasmiidne DNA, siRNA, splaissingut korrigeeriv oligonukleotiidid (SKO) ja mitmed teised nukleiinhapped on suure potentsiaaliga ravimikandidaadid. Nende rakendamist biomeditsiinis aga takistab see, et sellised suured ja hüdrofiilsed molekulid ei suuda ise rakkudesse siseneda ja vajavad selleks transportsüsteemide abi. Üheks sellistest süsteemidest on rakku sisenevad peptiidid (RSP). Praeguseks on avastatud ja sünteesitud üle tuhande erineva primaarjärjestuse või modifikatsioonidega RSP, mis suudavad transportida nii nukleiinhappeid kui ka teisi bioloogilise aktiivsusega molekule nii *in vitro* kui *in vivo*.

Vaatamata sellele, et RSP-sid uuritakse juba pikka aega on nende kasutuselevõtt biomeditsiinis ja ravimitööstuses seotud teatud probleemidega. Üks olulisematest probleemidest on see, et puudub täpne arusaamine, milliste mehhanismide abil vahendavad RSP-d nukleiinhapete transporti rakkudesse. Kuigi tänaseks on selge, et enamasti toimub RSP ja nukleiinhappe komplekside rakku sisenemine endotsütoosi teel, ei ole teada, kas samad mehhanismid toimivad erinevates rakuliinides. Üks viis selle selgitamiseks on uurida, missugused retseptorid interakteeruvad kompleksidega rakkude pinnal. Vastus sellele küsimusele annab võimaluse täpsemalt aru saada transfektsiooni mehhanismidest ning saadud teadmised võimaldavad tulevikus muuta RSP-de kasutamist efektiivsemaks.

Antud töö eesmärgiks oli välja selgitada, kas RSP-pDNA kompleksid põhjustavad püüdurretseptorite eksponeerimist raku plasmamembraanile erinevates rakuliinides. Samuti üritati välja selgitada missugused endotsütoosirajad vahendavad RSP-pDNA nanokomplekside sisenemist rakkudesse *in vitro* ning analüüsiti komplekside transfektsiooniefektiivsust plasmiidilt markervalgu ekspresseerimise alusel.

1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1.1 Rakku sisenevad peptiidid

Rakku sisenevad peptiidid (RSP) (i.k. „*cell-penetrating peptides*”; CPP) on 5 kuni 40 aminohappest koosnevad järjestused, mis on võimelised indutseerima enda transporti rakkudesse ning viima kaasa kovalentselt või mittekovalentselt seotud bioaktiivseid molekule (Langel jt, 2011). Esimene selline peptiid Tat avastati HIV viirusest 1988. aastal (Frankel A.D, Green M, 1988). Järgnevalt leiti sama omadus Antennapedia transkriptsioonifaktori homeodomeenil (A. Joliot jt, 1991), millest hiljem defineeriti 16 aminohappest koosnev funktsionaalne järjestus, mida tuntakse penetratiini nime all (D. Derossi jt, 1994). Praeguseks on avastatud üle tuhande erineva RSP (CPPsite 2.0) ning neid klassifitseeritakse erinevate tunnuste järgi. Üks viis, kuidas RSP-sid klassifitseeritakse on nende päritolu järgi, eristades kolme rühma. Looduslikud RSP-d, näiteks Tat, penetratiin ja Herpes viirusest pärit VP22 on saadud looduses leiduvates järjestustest. Teise rühma kuuluvad sünteetilised RSP-d, mis on sünteesitud, teades missugused omadused annavad peptiididele rakku penetreerimise võime ning mille hulka kuuluvad näiteks nona-arginiin, CADY, MAP. Viimase rühma moodustavad niinimetatud kimäärsed RSP-d, mis koosnevad kahest erinevast peptiidist. Näiteks transportaan koosneb neuropeptiid galaniinist ja herilase mürgi peptiidist mastoparaan (M. Pooga jt, 1998). Ziegler klassifitseeris RSP-d sekundaarstruktuuri alusel kui primaarsed amfipaatsed, sekundaarsed amfipaatsed ja mitteamfipaatsed peptiidid. Igasse rühma kuuluvad peptiidid omavad karakterseid struktuure ja vastavalt nendele interakteeruvad erinevalt raku plasmamembraaniga (A. Ziegler, 2007).

1.2 RSP-de kasutamine transportvektorina

Lastmolekuli transpordiks rakku on vajalik see siduda RSP-ga. Selle jaoks on kaks võimalust, kas kovalentse sideme tekitamine RSP ja lastmolekuli vahel või mittekovalentne komplekside moodustamine, mis põhineb elektrostaatilistel ja hüdfoobsetel interaktsioonidel RSP ja lastmolekuli vahel.

Kovalentse strateegia puhul ühendatakse RSP lastmolekuliga tihti disulfiidsideme abil, mis dissotsieeritakse raku tsütoplasmas, vabastades seeläbi transporditava molekuli (J.J. Turner jt, 2007). Disulfiidsideme asemel on võimalik kasutada ka amiid, tiasolidiin või hüdrasiinsidemeid (D.A. Stetsenko jt, 2000), kuid sel juhul võib lastmolekul muutuda inaktiivseks. Kovalentse strateegia puhul tekivad täpselt defineeritud RSP-lastmolekuli konjugaadid. Samas on nende süntees keeruline ja kallis ning sobib eelkõige neutraalsete või väikese laenguga molekulide transportimiseks. Lisaks on bioloogiline efekti saamiseks vaja kasutada suuremaid RSP ja lastmolekuli kontsentratsioone kui komplekside moodustamise

strateegia puhul.

Teine võimalus, kuidas saab ühendada RSP-d lastmolekuliga, on mittekovalentne sidumine. Vastandmärgilise laengu tõttu moodustavad RSP-d lastmolekuliga kokkusegamisel nanokompleksid, mida hoiavad koos peamiselt elektrostaatilised ja hüdrofoobsed interaktsioonid. Esimesena rakendasid seda strateegiat Morris jt, kes näitasid, et MPG peptiid suudab viia rakku nii üheaahelalisi kui ka kahelalisi oligonukleotiide (M.C. Morris jt, 1997). Rittner jt, olid mõned esimesest, kes viisid plasmidi rakku kasutades mittekovalentset seondumist JTS-1 RSP-ga, mille algses järjestuses olnud glutamiinhapped oli asendatud lüsiinidega või arginiinidega (K. Rittner jt, 2002). Mittekovalentne strateegia on võrreldes kovalentse strateegiaga lihtsam, kiirem ja odavam. Lisaks saavutatakse bioloogiline efekt kasutades väiksemaid kontsentratsioone, mis omakorda vähendab nanokomplekside võimalikku toksilist toimet rakkudele. Selline meetod sobib hästi splaissingut korregeerivate oligonukleotiidide (SKO), siRNA ja plasmiidide transportimiseks rakkudesse. Üks suuremaid miinuseid mittekovalentse strateegia puhul on see, et ei ole võimalik täpselt kirjeldada, kuidas kompleks on moodustunud, aga on võimalik mõõta füüsikalisi parameetreid, näiteks suurust ja laengut. Teiseks probleemiks on see, et ei ole täpselt teada komplekside sisenemise mehhanismid. Lisaks võivad mõned kompleksid olla ebastabiilsed ning laguneda teiste bioloogiliste molekulide juuresolekul, näiteks seerumis või veres.

1.3 Endotsütoos

Vaid väikesed ja laenguta molekulid suudavad passiivselt läbida raku plasmamembraani, mis on barjäär raku tsütosooli ja väliskeskkonna vahel. Osa molekule transporditakse läbi valguliste kanalite ja pumpade. Suure molekulmassiga hüdrofiilseid molekule on võimalik rakku transportida ainult endotsütoosi teel. Endotsütoos on ATP energiat nõudev molekulide transport rakkudesse, mille käigus makromolekulid inkorporeeritakse transportvesiikulitesse. Sõltuvalt mootor- ja markervalkudest eristatakse mitu erinevat tüüpi mehhanismi: klatriin- või kaveoliin-sõltuvat endotsütoosi, makropinotsütoosi ning klatriin- ja kaveoliin-sõltumatut endotsütoosi.

Klatriin-sõltuv endotsütoos on kõige paremini kirjeldatud endotsütoosi mehhanism ning see esineb kõikides rakkudes. Sellega kontrollitakse retseptorite hulka plasmamembraanil ning viiakse signaalmolekule rakkudesse (M. H. McMahon, 2011). Antud endotsütoosi tüüpi teostab klatriin, mis on ühendatud membraaniga abi valkude komplekside kaudu. Mõned sellised olulised valgud klatriin-vahendatud endotsütoosis on näiteks adapter valk 2 (AP2), AP180 ja epsiin (M. Marsh ja M. H. McMahon, 1999). Endotsütoos algab spetsiaalsetes kohtades, mis sisaldavad palju klatriini – klatriinga kaetud lohukestes.

Transporditava molekuli seostumine retseptoritega käivitab plasmamembraani deformatsiooni, mida teostavad klatriin-adapter valgu kompleksid (S. D. Corner ja S. L. Schmid, 2003). Deformatsiooni käigus moodustub transporditavaid molekule sisaldav sfääriline sissesopistus. Sissesopistus lõigatakse plasmamembraanist lahti GTP-aasset aktiivsust omava dünaamiini abil, tekitades klatriiniga kaetud vesiikuli (KKV), mis transporditakse varastesse endosoomidesse (T. Harvey jt, 2011).

Kaveoliin-sõltuv endotsütoos on alternatiivne viis, kuidas molekule transporditakse läbi plasmamembraani. See esineb paljudes rakkudes ning on aktiivselt kasutatuses endoteeli rakkudes ja adipotsüütides (R.G. Parton ja K. Simons, 2007). Kaveoliin-sõltuv endotsütoos toimub kolesterooli- ja sfingolipiidirikastes plasmamembraani piirkondades, niinimetatud lipiidsetes parvedes (i.k. „*lipid rafts*“). Üheks olulisimaks valkudest kaveoliin-vahendatud endotsütoosis on kaveoliin, mis seostub kolesterooliga ja osaleb plasmamembraanil, silindri- või kolvitaoliste sissesopistuste moodustumisel. Pärast sissesopistuste tekkimist lõigatakse need plasmamembraanist dünaamiini abil. Kaveoliin-vahendatud endotsütoosi initsiatsiooni mehhanismid ei ole üheselt selged, kuid arvatakse, et kaveoolid sisaldavad retseptoreid, mis on olulised endotsütoosi alustuseks (C. M. Thomas ja E. J. Smart, 2008). On näidatud, et kaveoliini mitteekspresseerivad endoteelirakud ei suuda albumiini keskkonnast omastada. (S. D. Corner ja S. L. Schmid, 2003). Samuti toimub kaveoliin-sõltuva endotsütoosi abil kolesterooli ja mitmesuguste signaalmolekulide transport (C. M. Thomas ja E. J. Smart, 2008). Lisaks kasutavad mõned patogeenid seda rada rakku tungimiseks (C. M. Thomas ja E. J. Smart, 2008).

Makropinotsütoos on üks klatriin-sõltumatu endotsütoosi variantidest. Protsessi käivitab signaalmolekulide seostumine retseptoritega, näiteks kolooniaid stimuleeriv faktor 1 (CSF-1) indutseerib karaktersete suurte lamellipoodide tekke, mis ühinedes plasmamembraaniga moodustavad suuri vesiikuleid – makropinosoome (J. P. Lim ja P. A. gleeson, 2011). Selle mehhanismi käivitavad tsütoskeletis paiknevad aktiini filamendid, mille polümerisatsioon käivitatakse Rho-perekonna GTP-aaside aktivatsiooniga (S. D. Corner ja S. L. Schmid, 2003). Makropinotsütoos täidab mitte ainult endotsütoosi rolli, vaid ta osaleb ka teistes raku protsessides, näiteks migratsioonis (A. Ridley jt, 2001). Makropinosoomid on võrreldes KKV ja kaveoliin vesiikulitega palju suuremad, makropinosoom on umbes 100 korda suurem kui KKV (S. Falcone jt, 2006). Samuti nagu kaveoliin-vahendatud endotsütoosiga sisenevad makropinotsütoosi teel rakkudesse mõned patogeenid, näiteks viirused ja priionid (J.P. Lim jt, 2011).

Klatriin- ja kaveoliin-sõltumatu endotsütoosi mehhanismid on alternatiivsed rajad makromolekulide ja osakeste transportimiseks läbi raku plasmamembraani. Nende

toimemehhanismid ja funktsioonid ei ole seni hästi kirjeldatud. Klatriin-sõltumatuid endotsütoositeid saab omakorda jagada kaheks: dünaamiinist sõltuvad ja -sõltumatud (S. Mayor ja R. E. Pagano, 2007). Dünaamiin-sõltuvas klatriin-sõltumatus endotsütoosis kasutatakse teisi GTP-aase, näiteks RhoA-d (S. Mayor ja R. E. Pagano, 2007). See endotsütoositee vastutab IL-2R- β internaliseerumise eest, kuid transpordib ka muid valke immuunrakkudes ja fibroblastides (S. Mayor ja R. E. Pagano, 2007). Dünaamiinist ja klatriinist sõltumatu endotsütoos kasutab CDC42 ja ARF6 GTP-aase. Selle mehhanismi abil on näidatud näiteks koolera toksiin B, taimse valgu ritsiini ja VacA rakkudesse sisenemist (S. Mayor ja R. E. Pagano, 2007). Kaveoliin-sõltumatu endotsütoosi hulka kuulub flotiliinidel põhinev transpordirada, milles on oluline roll flotiliin-1 ja flotiliin-2 valkudel (G. P. Otto ja B. J. Nichols, 2011). Flotiliinidega vahendatud endotsütoosil tekivad iseloomulikud tubulaarsed plasmamembraani sissesopistused (G. P. Otto ja B. J. Nichols, 2011). Flotiliini-vahendatud endotsütoosi on näidatud glükosfingolipiid GM1 transpordis HeLa rakku (G. P. Otto ja B. J. Nichols, 2011).

1.4 RSP-de kasutamine *in vivo*

Makromolekulaarsete ravimite arendamise osakaal on viimasel aastakümnel ravimitööstuses suurenenud. Üheks kitsaskohaks makromolekulaarsete ravimite väljatöötamisel ja rakendamisel on see, et need ei suuda ise läbida rakke ümbritsevat plasmamembraani ning nad vajavad transportimiseks spetsiaalseid süsteeme. Üheks selliseks võimaluseks on RSP-d, mis omavad võimet transportida nii makro- kui väikseid bioloogilisi molekule tsütosooli ja tuuma. Fawell jt, näitas esimesena, et kovalentselt TAT valguga seotud β -galaktosidaas on võimeline akumulieruma hiirte organites, pärast veeni süstimist (S. Fawell jt, 1994). Need tulemused panid aluse teiste komplekside ja liitvalkude sünteesimiseks, et arendada RSP *in vivo* kasutamist. Varsti pärast esmaseid rakendusi jõuti ka RSP ja terapeutiliste molekulide konstruktide kasutamiseni. Rousselle jt, näitasid oma töös, et D-penetratiini ja doksorubitsiini konjugaat suudab läbida vere-aju barjääri ning ravimi kontsentratsioon rakkudes on kõrgem võrreldes tavalise doksorubitsiiniga (C. Rousselle jt, 2000). Süstemaatiline Bucci jt, poolt sünteesitud kimäärse konjugaadi Antp ja kaveoliin-1 kinnitUSDomeeni manustamine vähendas hiirtes põletiku tekkimist (M. Bucci jt, 2000). Need tööd on näidanud, et RSP konjugaate on võimalik kasutada terapeutiliste efektide saamiseks.

Eraldi võib välja tuua nukleiinhapete transportimise kasutades RSP-sid. Plasmiidne DNA, siRNA ja teised ON-d on perspektiivsed geneetilised terapeutikumid, mille transportimist on palju uuritud. Nukleiinhapete transpordiks on võimalik kasutada nii kovalentset kui mittekovalentset strateegiat. Pooga jt näitasid, et pAntp või Transportaaniga

kovalentselt ühendatud galaniini retseptor-1 antisens peptiidse nukleiinhappega (PNA) on võimalik tekitada füsioloogilisi muudatusi rottide seljaajus (M Pooga jt, 1998). Ühena esimestest kasutas mittekovalentset strateegiat *in vivo* Rittner. Tema poolt modifitseeritud JTS1 peptiid moodustas plasmiidiga nanokomplekse ning pärast nende süstimist veeni leiti reportergeeni ekspressiooniprodukte hiire kopsu kudedes (K. Rittner jt, 2002). Hiljem on teised uurimisrühmad näidanud sarnaseid tulemusi, kasutades erinevaid RSP-sid ja nukleiinhappeid (K. Kurrikoff jt, 2015).

RSP-del põhinevate transportsüsteemide kasutamisega on seotud rida probleeme, näiteks võimalik ebaspetsiifilisus või -stabiilsus, toksilisus ja vähene võime vabaneda endosoomidest. Endosoomidest vabanemine ja stabiilsete komplekside moodustamine on võimalik lahendada RSP modifikatsioonidega. Näiteks PF6 (Joonis. 1) moodustab siRNA-ga stabiilseid komplekse ning inhibeerib hiirtes endogeensete geenide ekspressiooni erinevates organites (S. el Andaloussi jt, 2011). Spetsiifilisuse all mõistetakse, et kompleksid transfekterisid selektiivselt patoloogilisi rakke või kudet. Spetsiifilisuse saavutamiseks on võimalik kasutada kahte mehhanismi. Esimese korral lisatakse RSP-le spetsiifiline peptiidjärjestus, mis seostub märklaudrakkudega. Üheks selliseks peptiidiks on Myrbergi poolt sünteesitud pVEC-PEGA, kus PEGA on spetsiifiliselt rinnavähi rakkudega seonduv peptiid. Hose järjestusega, mis on glioomi rakkudega seostuv peptiid, sarnase konstrukti sünteesis Eriste (E. Eriste jt, 2013). Tähelepanuväärne on see, et saadud molekulid suurendasid tugevasti ravimi kontsentratsiooni vastavates kasvajates. Teine võimalus lahendada spetsiifilisuse probleem on aktiveeritavate RSP-de kasutamine, modifitseerides RSP-sid nii, et RSP-de transfektsioonivõime aktiveerub ainult spetsiifilises tingimustes. Aktivatsiooni võivad esile kutsuda kas teatud ensüümid (Jiang jt, 2004), pH erinevus (Lee Es jt, 2008) või muud tingimused (H. Harada jt, 2002; S. Moktan jt, 2012). Selliste transportsüsteemide toksilisuse kohta on keeruline üldistusi teha. Kõrvaltoimed sõltuvad kasutatava RSP omadustest organismist, lastmolekulidest ning paljudest teistest faktoritest, kuid suures osas on RSP-del põhinevad transportsüsteemid vähese toksilisusega (K. Kurrikoff jt, 2015).

1.5 PepFect peptiidide perekond

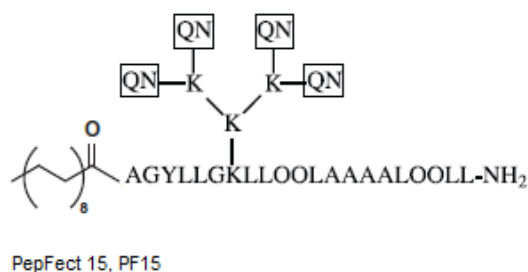
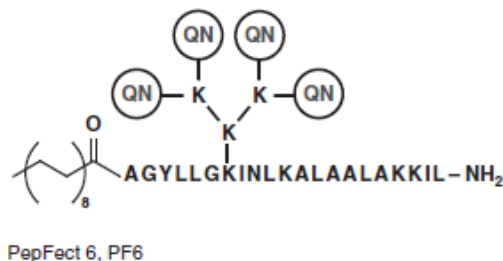
PepFect (PF) peptiidide perekond koosneb modifitseeritud TP10 variantidest ja neid saab pidada teise põlvkonna RSP-deks. PF-d moodustuvad kokkusegamisel nukleiinhapetega nanokomplekse. PepFect3 (PF3) põhineb TP10 järjestusel ning omab N-terminuses stearüülrühma. Rasvhappe lisamine suurendas PF3-ON nanokomplekside splaissingukorrektiooni efektiivsust HeLa pLuc 705 rakkudes (M. Mäe jt, 2009) ja PF3-

pDNA komplekside ekspressiooni efektiivsust *in vitro* ja *in vivo* (T. Lehto jt, 2011).

PepFect6 (PF6) disainiti PF3 baasil (Joonis 1), eesmärgiga parandada nanokomplekside vabanemist endosoomidest (S. el Andaloussi jt, 2011). PF6 omab stearüülrühma N-terminuses ning seitsmendas positsioonis paiknevale lüsiini külghelale on lisatud neli trifluorometüülkinoliini jääki (QN) (S. el Andaloussi jt, 2011). QN omab klorokviiniga sarnast efekti põhjustades endosoomide pundumist („*endosome swelling*“) ja lagunemist (A. El-Sayed jt, 2008). Tähelepanuväärselt omasid PF6-siRNA kompleksid *in vivo* katsetes kõrgemat siRNA efekti võrreldes PF3 kompleksidega ning saavutatud siRNA vaigistamise tase oli sarnane kommertsiaalse transfektsioonireagendiga LF2000 („*Lipofectamine 2000*™“, Invitrogen). Samas oli PF6-siRNA komplekside toksilisus väike ning rakkude elulemus ei vähenenud (S. el Andaloussi jt, 2011).

PepFect14 (PF14) põhineb samuti PF3 järjestusel. PF14 järjestuses asendati isoleutsiinid leutsiinidega ja lüsiinid ornitiinidega (Joonis 1), mis suurendavad afiinsust DNA suhtes ja aitavad seetõttu moodustada stabiilsemaid komplekse (K. Ezzat jt, 2011). Lüsiinide asendamine ornitiinidega oli tingitud sellega, et ornitiinipõhised süsteemid on efektiivsemad kui lüsiinipõhised (E. Ramsay ja M. Gumbelton, 2002). PF14 on edukalt kasutatud pDNA, siRNA ja SKO molekulide transportvektorina rakendades mittekovalentse seostumise strateegiat.

PepFect15 (PF15) ühendab endas PF6 ja PF14 modifikatsioone (Joonis 1). Uue peptiidse vektori efektiivsust kontrolliti miR-21 vastase miRNA oligonukleotiidi (AMO) ja spleissingut korrigeeriva oligonukleotiidi (SKO) transportimisega rakku. Saadud tulemused näitasid, et PF15 on oluliselt efektiivsem transfektsioonipeptiid kui PF14 ning AMO ja SKO efektide tase oli võrreldav LF2000 saaduga. Samuti nagu teiste PF perekonna peptiidide puhul oli PF15 komplekside toksilisus minimaalne võrreldes LF2000 transfektsioonireagendiga (S. Lindberg jt, 2013).



Joonis 1. PepFect perekonna peptiidide tuntumate liikmete struktuurid. PepFect3 on TP10 stearyliseeritud analoog. PepFect6 mis sisaldab nelja trifluorometüülkinoliini jääki (QN), mis lisatud 7 positsioonis paiknevale lüsiini külghelale kasutades lüsiinide puud (S. El Andaloussi, 2011). PepFect 14 on stearylühma sisaldav ja ornitiinidega modifitseeritud TP10 analoog. PepFect15 sisaldab nii PF6 kui ka PF14 modifikatsioone (S. Lindberg, 2013).

1.6 PepFect14 ja tema kompleksid nukleiinhapetega

Esimalt kasutati PF14 splaissingut korrigeerivate oligonukleotiidide (SKO) transportimiseks (K. Ezzat, 2011). Katsetes näidati, et PF14 on võimeline moodustama mittekovalentseid komplekse SKO-ga, mis on stabiilsed nii seerumvabas kui seerumit sisaldavas keskkonnas. PF14 transportis SKO-sid efektiivselt HeLa-pLuc705 ja MDX hiire müotubidesse, mis on Duchenne lihasedüstroofia (*Duchenne muscular dystrophy*, DMD) mudel. SKO efekti detekteeriti vähemalt 60% rakkudes. Samuti näitasid autorid, et PF14-SKO kompleksid on aktiivsed mitu päeva ja neid on võimalik lüofiliseerida ilma et transfektsiooniefektiivsus langeks, mis näitab komplekside kõrget stabiilsust (K. Ezzat jt, 2011). PF14 on võimeline ka teist tüüpi nukleiinhappemolekule rakkudesse transportima. K-L Veiman näitas, et PF14 moodustab komplekse ka pDNA molekulidega (PF14-pDNA), mis on stabiilsed seerumi juuresolekul ning suudavad transfecteerida rakke oluliselt efektiivselt kui samast peptiidiperekonnast PF3 (K-L. Veiman jt, 2013).

PF14-SKO ja PF14-pDNA komplekside füüsikaliste parameetrite iseloomustamisel on näidanud, et sõltumata söötme keskkonnast, milles kompleksid valmistati, omavad nad negatiivset zeta-potentsiaali. PF14-SKO jaoks on potentsiaal keskmiselt -11 mV seerumit sisaldavas söötmes (K. Ezzat jt, 2012) ning PF14-pDNA komplekside laengu keskmine väärtus on -26 mV vastavas keskkonnas (K-L. Veiman jt, 2013). H. Margus jt näitasid transmissioon elektronmikroskoobi (TEM) analüüsiga, et PF14-pDNA nanopartiklide kuju on varieeruv ja võib olla sfääriline, ellipsoidne või hargnenud ning partiklite keskmine diameeter

on 50 – 60 nm, PF14-SKO ja PF14-siRNA kompleksid on väiksemad ja nende suurused on vahemikus 20 – 40 nm. (H. Margus jt. 2015). PF14 ja nukleiinhappe komplekside toksiline mõju rakkudele on väike ja rakkude elujõulisus ei vähene (K-L Veiman jt, 2013).

1.7 NickFect peptiidide perekond

NickFectid on RSP-de perekond, mis kuulub teise põlvkonna RSP-de hulka. Üks osa peptiide selles perekonnas disainiti eesmärgiga saada kõverust omava struktuuriga RSP-d efektiivseks nukleiinhapete transportimiseks. Selliste transfektsioonipeptiidide esindajaks on NF51, NF53 ja NF61. Nendest kolmest peptiidist kõige efektiivsem oli NF51. NF51 aluseks on võetud TP10, mille N-terminaalsesse otsa on lisatud stearüülrühm (M. Mäe jt, 2009). NF51 seitsmenda positsioonis paiknev lüsiin asendati ornitiiniga ning kuuendas positsioonis olev glütsiin seoti ornitiini δ -NH₂ rühma, mitte α -NH₂ rühma külge. P. Arukuusk jt näitasid et NF51 on võimalik kasutada pDNA, SKO ja siRNA transportvektorina (P. Arukuusk jt, 2013).

Teine osa NF tüüpi peptiididest on fosforüleeritud. Need RSP-d disainiti eesmärgiga muuta PF3 vektor pH-tundlikuks ning suurendada RSP interaktsioone plasmamembraaniga (N. Oskolkov jt, 2011). Siia rühma kuuluvad fosfaatrühma sisaldavad NF1 ja NF2, milles on kaheksandas positsioonis paiknev isoleutsiin asendatud treoniiniga. Peamiselt on nende peptiidide abil transporditud SKO-sid.

1.8 NickFect51 ja tema kompleksid

NF51 ja SKO, siRNA või pDNA inkubeerimisel sobivas vahekorras moodustuvad negatiivse laenguga kompleksid, mis on stabiilsed seerumit sisaldavas keskkonnas (P. Arukuusk jt, 2013). NF51 kompleksid omavad sfäärilist kuju sõltumata sellest, missugust tüüpi nukleiinhapet kasutada, ning nende suurused varieeruvad 30 kuni 50 nm. (H. Margus jt, 2015). NF51-pDNA kompleksid on võimelised efektiivselt transfekterima suurt hulka erinevaid rakuliine, näiteks CHO, U87, HeLa ja U2SO (P. Arukuusk jt, 2013). NF51-pDNA komplekside transfektsiooni efektiivsus on samaväärne kommertsiaalse LF2000-ga seerumit sisaldavas rakusöötmes või isegi kõrgem sõltuvalt rakuliinist. Lisaks sellele on näidatud, et NF51-pDNA kompleksid on efektiivsed ka raskesti transfekteritavates rakkudes nagu näiteks Jurkat, A20 ja MEF. NF51 on võimalik rakendada ka imetajate valkude tootmisesüsteemis QMCF tehnoloogiaga (P. Arukuusk jt, 2013).

NF51-SKO komplekside stabiilsus ja tranfektsiooni efektiivsus on kõrge. Komplekse on võimalik detekteerida rakkudes 4 tunni pärast keskkonda lisamist ja nii seerumit sisaldavas kui seerumvaba keskkonnas oli lutsiferaasi ekspressiooni tase oli 100 kõrgem võrreldes kontroll rakkudega (P. Arukuusk jt, 2013).

NF51-siRNA kompleksid on labiilsemad võrreldes NF51-pDNA kompleksidega ning nende efektiivsus sõltub tugevasti seerumi olemasolust keskkonnas. Seerumvabas keskkonnas on võimalik detekteerida siRNA efekti 90% rakkude populatsioonist, aga seerumi juuresolekul detekteeriti bioloogilist aktiivsust ainult 60% rakkudest. Samal ajal olid transfektsiooniefekti saavutamiseks vajaminevad siRNA ja peptiidi kogused väikesed, peptiidil 0,5 või 1 μM ja siRNA kontsentratsioon vahemikus 20 kuni 50 nM. Komplekside toksilisuse kontroll, kasutades CytoTox-GloTM meetodit näitas, et NF51 kontsentratsioonid vahemikus 0.5 kuni 1 μM ei vähenda rakkude ellujäämist ja funktsionaalsust (P. Arukuusk jt, 2013).

1.9 PF14 ja NF51 komplekside internaliseerumine

PF14 ja NF51 RSP-d on efektiivsed nukleiinhapete transportimise süsteemid nii *in vitro* kui *in vivo*, kuid nende laiemaks rakendamiseks biomeditsiinis ja uurimistöös on vaja teada nende toimemehhanisme. PF14-SKO kompleksidega 4 °C juures töödeldud rakkudes on SKO bioloogiline aktiivsus märgatavalt väiksem, mis näitab, et kompleksid internaliseeritakse rakkude poolt, kasutades energiat vajavaid transportmehhanisme, s.t. endotsütoosi abil. Seda tõestab ka fakt, et klorokviini (põhjustab endosoomide pundumist ja lõhkemist) olemasolu keskkonnas suurendab SKO efekti, samal ajal kui transfektsiooni efektiivsus jääb samaks, viidates et PF14-SKO kompleksid transporditakse endosoomidesse ning klorokviin aitab nanokompleksidel nendest väljuda (K. Ezzat jt, 2011). Teades, et kompleksid omavad negatiivset pinnalaengut, pakuti, et nad interakteeruvad rakupinnal spetsiifiliste retseptoritega, mis suudavad negatiivse laenguga partikleid seondada. Sobivamaks kandidaadiks peeti püüdurretseptorite tüüp A perekonda (i.k. „*scavenger receptors class A*“) (SR-A), kuna varem näidati, et negatiivse laenguga nanokompleksid transporditakse rakku SR-A retseptorite abil (S. Nagayama jt, 2007). Kasutades RT-PCRi näidati, et HeLa rakkudes on olemas kaks klass A tüüpi püüdurretseptoreid: SR-A3 ja SR-A5 ning nende ekspressiooni mahasurumine siRNA-ga vähendab drastiliselt PF14-SKO komplekside splaissingu efektiivsust HeLa rakkudes (K. Ezzat jt, 2012). Hiljuti näitasid S. Lindberg jt, et SR-A3 ja SR-A5 retseptorite üleekspressioon tõstab PF14-pDNA komplekside transfektsiooni efektiivsust (S. Lindberg jt, 2015). C. Juks koos kolleegidega leidis hiljuti, et SR-A3 ja SR-A5 retseptorid puuduvad tavatingimustes HeLa rakkude pinnal ning neid eksponeeritakse vaid siis, kui keskkonnas on PF14-SKO kompleksid. Need tulemused kinnitasid SR-A3 ja SR-A5 retseptorite olulisust PF14 peptiidiga moodustatud nanokomplekside internaliseerumises. Kasutades endotsütoosi farmakoloogilisi inhibiitoreid leiti, et kõige rohkem mõjutas RSP-SKO nanokomplekside splaissinguefektiivsust HeLa rakkudes amiloriid, mis inhibeerib

makropinotsütoosi, ning mõnevõrra ka nüstatiin, mis on kaveoliin-sõltuva endotsütoosi inhibiitor. Makropinotsütoosi osalus PF14-SKO komplekside internaliseerumises kinnitati ka TEM abil, kus oli näha, et kompleksid paiknesid plasmamembraanil lamellipoodides, mis on iseloomulikud makropinosoomide tekkele (C. Juks jt, 2015).

Ka pDNA kompleksid NF51-ga on negatiivse laenguga ning kasutavad internaliseerumiseks SR-A retseptoreid. P. Arukuusk koos kolleegidega näitas, et HeLa rakkude töötlus SR-A inhibeeritavate ligandidega vähendab NF51-pDNA komplekside transfektsiooni efektiivsust (P. Arukuusk jt, 2013). Nii näiteks töötlus dekstraan-sulfaadiga vähendas NF51-pDNA ja NF1-pDNA transfektsiooni 90% võrra, fukoidaan omakorda vähendas lutsiferaasi ekspressiooni 90% võrra. Farmakoloogiliste inhibiitorite abil näidati, et ka NF51 peptiidiga moodustatud kompleksid internaliseeritakse makropinotsütoosiga ning klatriin- ja kaveoliin-vahendatud endotsütoosi inhibeerimine ei pärsi oluliselt plasmiidilt ekspressiooni (P. Arukuusk jt, 2013). NF51-pDNA komplekside sisenemine HeLa rakkudesse makropinotsütoosi teel kinnitati täiendavalt TEM-i abil, mis näitas komplekside paiknemist makropinotsütoosile omastes lamellipoodides, aga mitte kaveoliini- või klatriin-sõltuvale endotsütoosile väikestes invaginatsioonides (P. Arukuusk jt, 2013).

1.10 Püüdurreseptorid

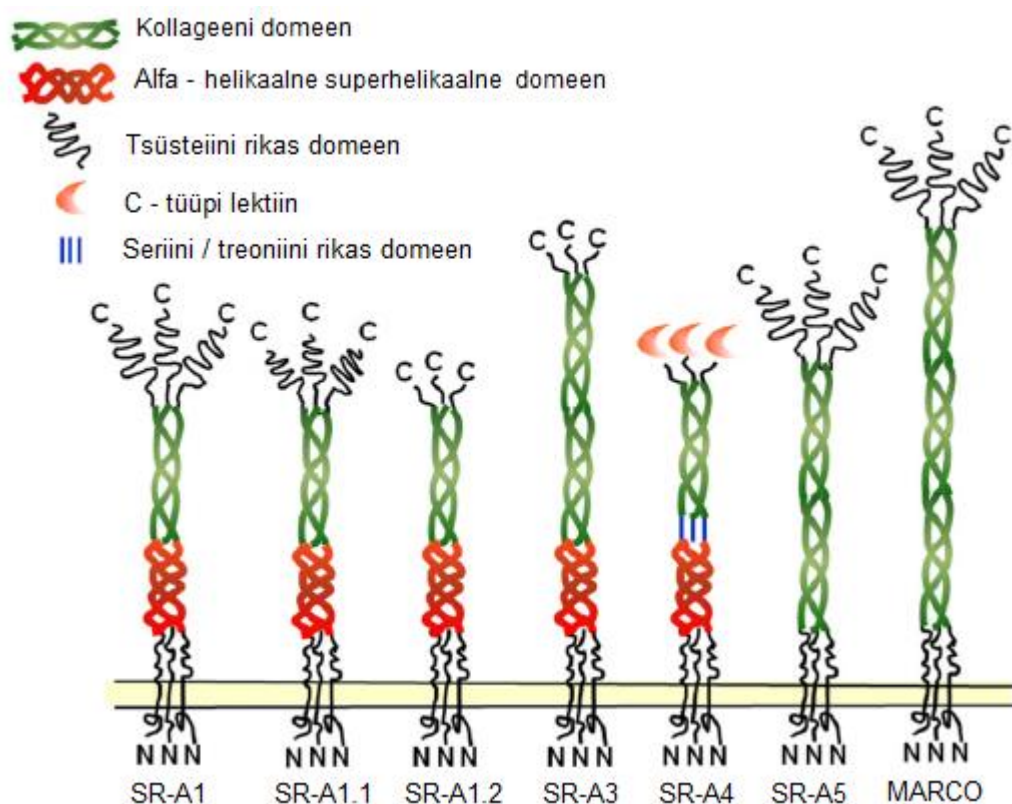
Püüdurreseptorid (i.k. *Scavenger receptors*, SR) – on suur transmembraansete retseptorite superperekond, mis täidavad erinevaid rakulisi funktsioone (A. Plüddemann jt 2007). Esimesed selle perekonna retseptorid avastati ja kirjeldati Goldstein ja Brown poolt aastal 1979 makrofaagidel, kus näidati nende võimet siduda atsetüleeritud ja oksüdeeritud madala tihedusega lipoproteiine (LDL) (M. S. Brown ja J. L. Goldstein, 1979). Praeguseks on näidatud, et SR-d tunnevad ära väga laia valikut erinevate omadustega molekule, näiteks beta-amüloide, kollageeni, apolipoproteini A1 ja E (J. E. Murphy jt, 2005). SR-d osalevad endotsütoosis ja immuunsüsteemi protsessides, tunnevad ära nii Gram-positiivseid kui ka Gram-negatiivseid baktereid ning on olulised rakkude adhesioonis (J. L. Kelley jt, 2014).

Püüdurreseptorid jagatakse kaheksasse klassi: A – H, kus need on grupeeritud sarnaste struktuuride ja järjestuste alusel (A. Plüddemann jt, 2007; M. Prabhudas jt, 2014). Püüdurreseptorid on nüüdseks leitud mitte ainult makrofaagidel vaid praktiliselt kõigis imetajate rakutüüpides (J. E. Murphy jt, 2005) ning ka nematoodidel (T. K. Means jt, 2010).

1.11 Klass A püüdurreseptorid

Klass A püüdurreseptorite (SR-A) rühm koosneb viiest liikmest: SR-A1, mis omab kahte erinevat splaissingu varianti SR-A1.1 ja SR-A1.2, MARCO, SR-A3, SR-A5 ja SR-A4

(J. Ben jt, 2015). Nad on kõik teist tüüpi transmembraansed glükoproteiinid, mis moodustavad trimeere. Struktuurselt koosnevad SR-A-d järgmisest osadest: tsütoplasmaatiline saba, transmembraanne domeen, speiser järjestus („*spacer*“), alfa-helikaalne („*coiled coil*“) domeen, kollageenilaadne domeen ja tsüsteiinirikas domeen C-terminuses (A. Plüddemann jt, 2007). SR-A-d erinevad omavahel teatud struktuurielementide puudumise või olemasolu või modifikatsioonide osas (Joonis 2) (J. Ben jt, 2015). Ligandi sidumise piirkond paikneb SR-A kollageenilaadses domeenis, mis koosneb Gly-Xaa-Yaa kordusjärjestustest (T. Doi, jt 1993). Xaa ja Yaa võivad olla suvalised aminohapped, kuid on näidatud, et lüsiinid täidavad suur osa nendest positsioonidest ja see võimaldab retseptoritel siduda negatiivselt laetud ligande (T. Doi, jt 1993).



Joonis 2. Püüdurretseptorite klass A perekond. Retseptorid omavad sarnast struktuuri ja erinevad üksiksest modifikatsioonide olemasolu või struktuurikomponentide osalise puudumise poolest (J. Ben jt, 2015).

Peaaegu kõik SR-A retseptorid seovad modifitseeritud LDL molekule, kuid iga retseptor omab ka teisi funktsioone (J. E. Murphy jt, 2005). SR-A1 on võimeline ära tundma patogeene ja osaleb apoptootiliste tümotsüütide eemaldamises (J. L. Kelley jt, 2014). Selle retseptori abil indutseeritakse *Staphylococcus aureus* fagotsütoos ja mikroglia rakkudes endotsüteeritakse amüloid- β molekule (C. A. Thomas jt, 2000). MARCO on oluline immunsüsteemi toimimises ta on ekspresseeritud makrofaagidel kõrgel tasemel ning tunneb ära baktereid ja teisi õhu kaudu levivaid patogeene (J. E. Murphy jt, 2005). SR-A4, samuti nagu MARCO on seotud immuunsusega ning tunneb ära pärmi, Gram-negatiivseid ja Gram-positiivseid baktereid (K.

Ohtani jt, 2001). Tänu võimele siduda oksüdeeritud LDL molekule osaleb SR-A4 lipoproteiinide metabolismis endoteeli rakkudes (J. E. Murphy jt, 2005). Erandina ei suuda SR-A5 modifitseeritud LDL molekule siduda, kuid nende asemel seob ta ferritiini, transportides raua ioone rakkudesse (J. Y. Li jt, 2008). SR-A3 ei eksponeerita rakkude pinnale, kuna ta paikneb endoplasmaatilises võrgustikus, ning tema võime siduda ja transportida modifitseeritud LDL molekule on küsitav (A. Plüddemann jt, 2007). Samas näidati hiljuti, et SR-A3 osaleb PF14 vahendatud nukleiinhapete sisenemises rakkudesse (C. Juks jt, 2015).

2. EKSPERIMENTAALNE OSA

2.1 Töö eesmärgid

Käesoleva töö eesmärgid oli:

1. Kaardistada püüduretseptorite SR-A3 ja SR-A5 paiknemise HeLa ja A549 rakkudes PF14-pDNA ja NF51-pDNA nanokomplekside juuresolekul ning ilma.
2. Võrrelda PF14-pDNA ja NF51-pDNA nanokomplekside transfektsiooni efektiivsust HeLa ja A549 rakkudes.
3. Kontrollida, kas SR-A3 ja SR-A5 transpordi indutseerimine plasmamembraani PF14 ja NF51 abil tõstab ka vastavate pDNA-ga nanokomplekside transfektsiooni efektiivsust.
4. Analüüsida millised endotsütoosi rajad on olulised PF14-pDNA nanokomplekside transfektsioonis.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud rakuliinid

Antud töös kasutati emakakaelavähi rakke HeLa-pLuc705 ja inimese bronhoalveolaarse epiteeli vähi rakke A549. Rakke kasvatati +37 °C juures 5% CO₂ sisaldavas atmosfääris IMDM (“*Iscove`s Modified Dulbecco`s Medium*“, Corning, Manassas, VS, USA) söötmes, mis sisaldas 10% veise loote seerumit (Corning, Manassas, VS, USA), 100 UI/ml penitsillini ja 100 µg/ml streptomütsiini.

2.2.2 Kasutatud peptiidid ja nukleinhapped

Käesolevas töös kasutati Tartu Ülikooli Tehnoloogiainstituudis Molekulaarse biotehnoloogia grupi poolt sünteesitud peptiide:

PepFect14 (PF14) – stearüül-AGYLLGKLLOOLAAAALLOLL-NH₂

NikFect51(NF51) – stearüül-AGYLOINLKALAALAKKIL-NH₂

Töös kasutati pAc-β-aktiin-EGFP plasmidi (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) ja lutsiferaasi kodeerivat plasmidi pGL3 (Promega, Rootsi). Plasmiidide paljundamiseks kasutati DH5α kompetentseid baktereid ja puhastamiseks plasmidi puhastamise kitti “*QIAGEN Plasmid DNA Purification Kit*” (QIAGEN, Hilden, Germany).

Plasmiidi pGL3 märgistamiseks kasutati plasmiidi märgistamise kitti “*Mirus Label IT® CyTM5 Labeling Kit*” (Mirus Bio LLC, Madison, WI, USA).

2.2.3 Kasutatud antikehad

SR-A3 ja SR-A5 detekteerimiseks kasutati kitses toodetud primaarset antikeha anti-SCARA3 (Santa Cruz Biotechnology Inc, Heidelberg, Saksamaa, sc-87421) ja küülikus toodetud anti-SCARA5 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA, LOT: R12563) antikeha. Sekundaarsete antikehadena kasutati: küülikus toodetud kitse vastaseid AlexaFluor555 (Invitrogen, MS, USA) märgisega antikehasid ja kitses toodetud AlexaFluor555 (Invitrogen, MS, USA) märgisega küüliku vastaseid antikehasid.

Rakkude fikseerimiseks kasutati 3% paraformaldehüüdi (PFA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) lahust fosfaatpuhvris. Mittespetsiifilise seondumise blokeerimiseks kasutati lõssipulbrit (“*Non Fat Dry Milk*”, Amresco Inc, Solon, OH, USA) ja pesemiseks ühekordset naatriumfosfaat puhvrit (PBS, Corning, Manassas, VS, USA). Preparaadid sulundati 30% glütserooliga (PBSis) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

2.2.4 Kasutatud endotsütoosi inhibiitorid

Endotsütoosiradade osaluse uurimiseks RSP-pDNA nanokomplekside sisenemisel rakkudesse kasutati kloorpromasiini, 5-(N-etiül-N-isopropüül)-amiloriidi (EIPA), klorokviin (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) ja nüstatiini (Amresco Inc, Solon, OH, USA).

2.2.5 Plasmiidi transformeerimine

Transformeerimiseks kasutati kompetentseid DH5 α bakteri rakke. 100 μ l barteritele lisati 1 μ l (800 ng/ μ l) plasmiidse DNA lahust lõppkontsentratsiooniga 8000 ng/ml ja tehti kuumašokk kestvusega 3 minutit +42 $^{\circ}$ C juures, misjärel asetati bakterid 5 minutiks jääle. Järgnevalt lisati bakteritele vedelat LB (*Lysogeny Broth*) söödet 1 ml mahuni ja inkubeeriti 1 tund +37 $^{\circ}$ C juures kiirusega 300 pööret minutis (rpm). Pärast inkubatsiooni tsentrifugeeriti bakterid kiirusega 5000 rpmi ja eemaldati supernatant ettevaatlikult nii, et alles jäi umbes 100 μ l lahust. Seejärel bakterid suspendeeriti ning kanti 50 μ g/ml kanamütsiini sisaldavatele agarplaatidele ning kasvatati 14 tundi +37 $^{\circ}$ C juures.

2.2.6 Plasmiidse DNA paljundamine ja puhastamine

DNA paljundamiseks kasvatati pAc-EGFP ja pGL3 transformeeritud DH5 α kompetentseid rakke 14 tundi agarplaatidel, mis sisaldasid 50 μ g/ml kanamütsiini. Seejärel tõsteti igalt plaadilt üks koloonia 100 ml vedelasse LB-söötmesse mis sisaldas 50 μ g/ml kanamütsiini. Baktereid kasvatati 12 tundi +37 $^{\circ}$ C juures segamiskiirusega 180rpm.

Plasmiidi puhastamiseks kasutati pDNA puhastamise kitti “*QIAGEN Plasmid DNA Purification Kit*” (Qiagen N.V., Düsseldorf, Saksamaa) vastavalt tootjapoolsele protokollile. Plasmiidi kontsentratsioon määrati kasutades *NanoDrop-1000* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) vastavalt tootja instruksioonidele.

2.2.7 Rakku siseneva peptiidi ja plasmiidse DNA komplekside valmistamine

RSP-pDNA nanokomplekside valmisamiseks kasutati plasmiidi : peptiidi laengusuhet 1 : 3. Kasutatud pDNA lõppkontsentratsioon oli 0,5 µg ning peptiidide kontsentratsiooni arvutamiseks kasutati allolevat valemit:

$$RSP\ maht = \left(\frac{2 \times DNA\ kogus(\mu g) \times 10^6}{RSP\ laeng \times 660 \times RSP\ Stock\ lahus} \right) \times \frac{RSP}{pDNA}\ Suhe$$

RSP-pDNA nanokompleksid valmistati 1:10 transfektsiooniruumalast (50 µl) MilliQ kvaliteediga vees lisades esmalt plasmiidi ning seejärel peptiidi. Nanokomplekse inkubeeriti 1 tund toatemperatuuril ning vahetult enne inkubatsiooni algust lisati kompleksidele 10% FBSi sisaldav IMDM sööde kuni 500 µl mahuni.

2.2.8 Rakkude töötlemine RSP-pDNA kompleksidega

HeLa-pLuc705 ja A549 rakke kasvatati +37 °C juures 5% CO₂ sisaldavas keskkonnas, 10% FBS-i, 50 u/ml penitsilliin ja 50 µg/ml streptomütsiini sisaldavas IMDM söötmes. 48 tundi enne eksperimendi algust külvatati rakud tihedusega 20000 rakku/ml. 24-kannulisele plaadile, mille põhja olid eelnevalt asetatud 12 mm läbimõõduga steriilsed klaasid. Rakke pesti üks kord IMDM söötmega ning seejärel inkubeeriti RSP-pDNA 1 tund +37 °C juures 5% CO₂ sisaldavas keskkonnas.

2.2.9 Püüdurretseptorite detekteerimine

Rakke pesti esmalt ühekordse PBS-iga (PBS) ning seejärel fikseeriti 3%-lise PFA/fosfaatpuhvri lahusega 30 minutit jään. Pärast fikseerimist pesti rakke 3 korda 1xPBS-iga 5 minutit. Seejärel blokeeriti ebaspetsiifilised seondumissaidid värskelt valmisatud 5%-lise lõssipulbri (NFDm)/PBS lahusega 30 min, misjärel pesti rakke kolm korda 1xPBS lahusega. Seejärel inkubeeriti rakke 1 tund 30 µl-s kitses toodetud inimese SR-A3 vastase või küülikus toodetud inimese SR-A5 vastase primaarse antikehaga lahjendusega 1:100-le 1%-lises NFDm/PBS lahuses. Pärast primaarse antikehaga töötlust pesti rakke 3 korda PBS-iga. Järgnevalt inkubeeriti rakke 1 tund 30 µl sekundaarse antikehaga lahjendusega 1:500-le 1%-lises NFDm/PBS lahuses. SR-A3 detekteerimiseks kasutati AlexaFluor 555 märgisega küülikus toodetud kitse vastaseid antikehi ning SR-A5 detekteerimiseks kasutati AlexaFluor 555 märgisega kitses toodetud küüliku vastaseid antikehi. Pärast sekundaarse antikehadega

töötlust pesti rakke 3 korda PBS-iga. Tuumade visualiseerimiseks lisati rakkudele 400µl DAPI lahust lahjendusega 1:2000 ja proove inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit. Liigse DAPI eemaldamiseks pesti rake 3 korda PBS lahusega. Seejärel asetati proovid mikroskoobi alusklaasidele ning sulundati 5 µl 30%-lise glütserool/PBSi lahusega.

Proovid analüüsiti konfokaalmikroskoobiga FV 1000 OVF 10278 (Olympus, Tokyo, Japan). Kasutatud laserite lainepikkused olid 405 nm – DAPI, 537 nm - AlexaFluor555, 635 nm – Cyanine5 ja nende tugevus oli 5% maksimaalsest. Maksimaalne laserite tugevus on 40 mV. Preparaate analüüsiti õliimmersioonis 60- või 100-kordse suurundusega Olympuse objektiiviga (Olympus, Tokyo, Japan). Iga laseri signaali detekteeriti eraldi ning preparaate pildistati erinevatel Z-telje tasanditel.

2.2.10. Püüdurretseptorite raku pinnale indutseerimine ja rakkude transfekteerimine

24 tundi enne katse teostamist külvati HeLa-pLuc705 või A549 rakud 6-kannulisele plaadile tihedusega 15000–20000 rakku/ml ja inkubeeriti +37°C juures 5% CO₂ sisaldusega keskkonnas.

Rakke pesti IMDM söötmega ning SR-A retseptorite indutseerimiseks lisati PF14 või NF51 peptiidilahust 1 ml IMDM söötmesse lõppkonstentratsiooniga 1µM. Rakke inkubeeriti 1 tund +37 °C juures 5% CO₂ sisaldavas keskkonnas. Pärast inkubatsiooni transfekteeriti RSP-pDNA kompleksidega 1 tund +37 °C juures 5% CO₂ sisaldavas keskkonnas. Seejärel pesti rakke 0,2% heparaansulfaat/PBSi lahusega 5 minutit, lisati värske IMDM sööde ja inkubeeriti 24 tundi.

2.2.10a Läbivoolu tsütomeetria (FACS) proovide valmistamine ja analüüsimine

Rakkudelt eemaldati sööde ja lisati 500 µL trüpsiin-EDTA lahust ning inkubeeriti 3 min, +37°C temperatuuril. Trüpsiini aktiivsus inaktiveeriti 500 µL IMDM söötmega. Seejärel rakud suspendeeriti ja sadestati tsentrifugeerimisega kiirusega 1000 rpm-i +4°C juures 5 minutit. Supernatant eemaldati ettevaatlikult ja rakud suspendeeriti 250 µL-is PBS-is. Proovid asetati jääle kuni FACS analüüsi läbiviimiseni BD FACS Aria (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) aparaadiga. EGFP detekteerimiseks kasutati 488 nm lainepikkusega laserit tugevusega 17 mV.

2.2.11 Endotsütoosi radade analüüsimine

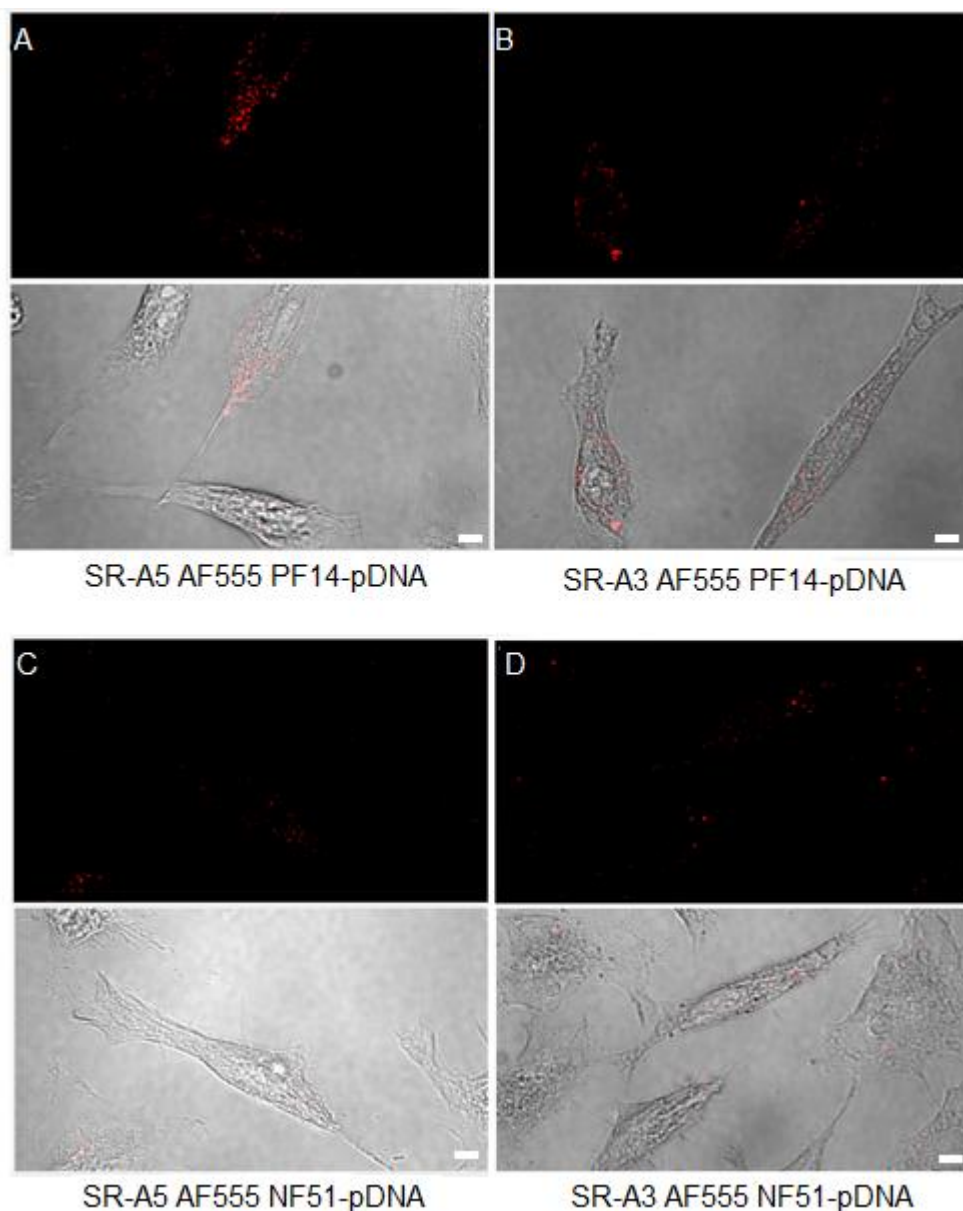
24 tundi enne katse teostamist külvati HeLa-pLuc705 või A549 rakud 24-kannulisele plaadile tihedusega 10000 rakku/ml ja inkubeeriti +37 °C juures 5% CO₂ sisaldusega inkubaatoris.

PF14-pDNA nanokompleksid valmistati nagu kirjeldatud peatükis 2.3.3, kasutades 0,5 µg pAc-EGFP plasmidi. Rakke pesti PBS-iga ja lisati 0,5 ml IMDM söödet mis sisaldas kas kloorpromasiini (10 µM, klatrin-vahendatud endotsütoosi inhibiitor), nüstatini (50 µM, kaveoliin-vahendatud endotsütoosi inhibiitor), EIPAt (100 µM, makropinotsütoosi inhibiitor), või klorokviini (100 µM, endosoomide hapustamise inhibiitor). Kõik kasutatud inhibiitorite alglahused olid 1000 kordse kontsentratsiooniga. EIPA ja nüstatin lahustati DMSO-s, kloorpromasiin ja klorokviin MilliQ vees. Rakke inkubeeriti inhibiitoritega 30 minutit +37°C temperatuuril, misjärel lisati eelnevalt moodustatud RSP-pDNA nanokompleksid ning inkubeeriti veel 4 tundi +37 °C juures 5% CO₂ sisaldusega keskkonnas. Järgnevalt pesti rakke 0.2% heparaansulfaat/PBSi lahusega ja lisati värske IMDM sööde ning proove inkubeeriti 24 tundi +37 °C temperatuuril. Pärast inkubatsiooni teostati FACS analüüs EGFP signaal detekteeriti BD FACSAria (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) aparaadiga, kasutades 488nm lainepikkusega laserit tugevusega 17mV.

2.3 Tulemused

2.3.1 SR-A retseptorite detekteerimine HeLa rakkude pinnal pärast inkubeerimist RSP-pDNA kompleksidega

Varasemalt on näidatud, et PF14-SKO kompleksid kasutavad rakku sisenemiseks kahte tüüpi SR-A retseptoreid: SR-A3 ja SR-A5, mis eksponeeritakse rakkude pinnale, et indutseerida komplekside transportimist HeLa rakkudesse (K. Ezzat jt, 2012). Teades seda, et PF14 võib moodustada komplekse nii SKO kui ka pDNA-ga ning mõlemad kompleksid omavad negatiivset pinnalaengut, siis tõenäoliselt PF14-pDNA komplekside olemasolu koekultuuri söötmes peaks indutseerima HeLa rakkudes SR-A3 ja SR-A5 retseptorite transpordi plasmamembraani. HeLa rakkude ühetunnine inkubatsioon PF14-pDNA komplekside sisaldavas söötmes ja SR-A retseptorite kaudne immunofluorestsentsmärgistamine näitas, et rakkude pinnale tõepoolest eksponeeritakse SR-A5 (Joonis 3, A) ja SR-A3 retseptorid (Joonis 3, B), kus punane signaal näitab retseptorite olemasolu. SR-A5 retseptorite immunofluorestsentsi signaal rakupinnal on tugevam kui SR-A3, näidates et nende arv pinnal võib olla suurem. HeLa rakkude inkubeerimine ainult vastava RSP-ga põhjustab samuti SR-A5 ja SR-A3 retseptorite suunamise plasmamembraani pinnale (Lisajoonis 1. A ja B), aga immunofluorestsentssignaali intensiivsus ja retseptorite klastrite hulk on võrreldes kompleksi sisaldavas söötmes inkubeerituga väiksem. Ainult plasmidi lisamine rakkude keskkonda ei põhjusta retseptorite eksponeerimist, mis näitab, et PF14 või tema kompleksid nukleiinhappega on vajalikud SR-A5 ja SR-A3 retseptorite suunamiseks rakkude plasmamembraani. See tulemus on kooskõlas varem leitud, et SR-A spetsiifiliselt tunnevad ära PF14 peptiidi. (S. Lindberg jt, 2015)



Joonis 3. Püüduretseptorite SR-A5 ja SR-A3 paiknemine HeLa rakkude pinnal pärast inkubatsiooni RSP-pDNA kompleksidega. A. SR-A5 retseptorite paiknemine rakkude pinnal detekteerituna SCARA-5 antikehadega pärast 1t inkubatsiooni PF14-pDNA kompleksidega. B. SR-A3 retseptorid tuvastatuna SCARA-3 antikehade ja vastava sekundaarsete antikehadega pärast inkubatsiooni PF14-pDNA kompleksidega. C. SR-A5 retseptorite paiknemine pinnal pärast inkubatsiooni NF51-pDNA kompleksidega tuvastatuna vastava primaarse ja sekundaarsete antikehadega. D. SR-A3 retseptorite tuvastamine pinnal SCARA-3 antikehade ja vastava sekundaarse antikehadega pärast inkubatsiooni NF51-pDNA kompleksidega. Sekundaarsed antikehad on märgistatud AlexaFluor555-ga. Mõõtlõik on 10 μ m.

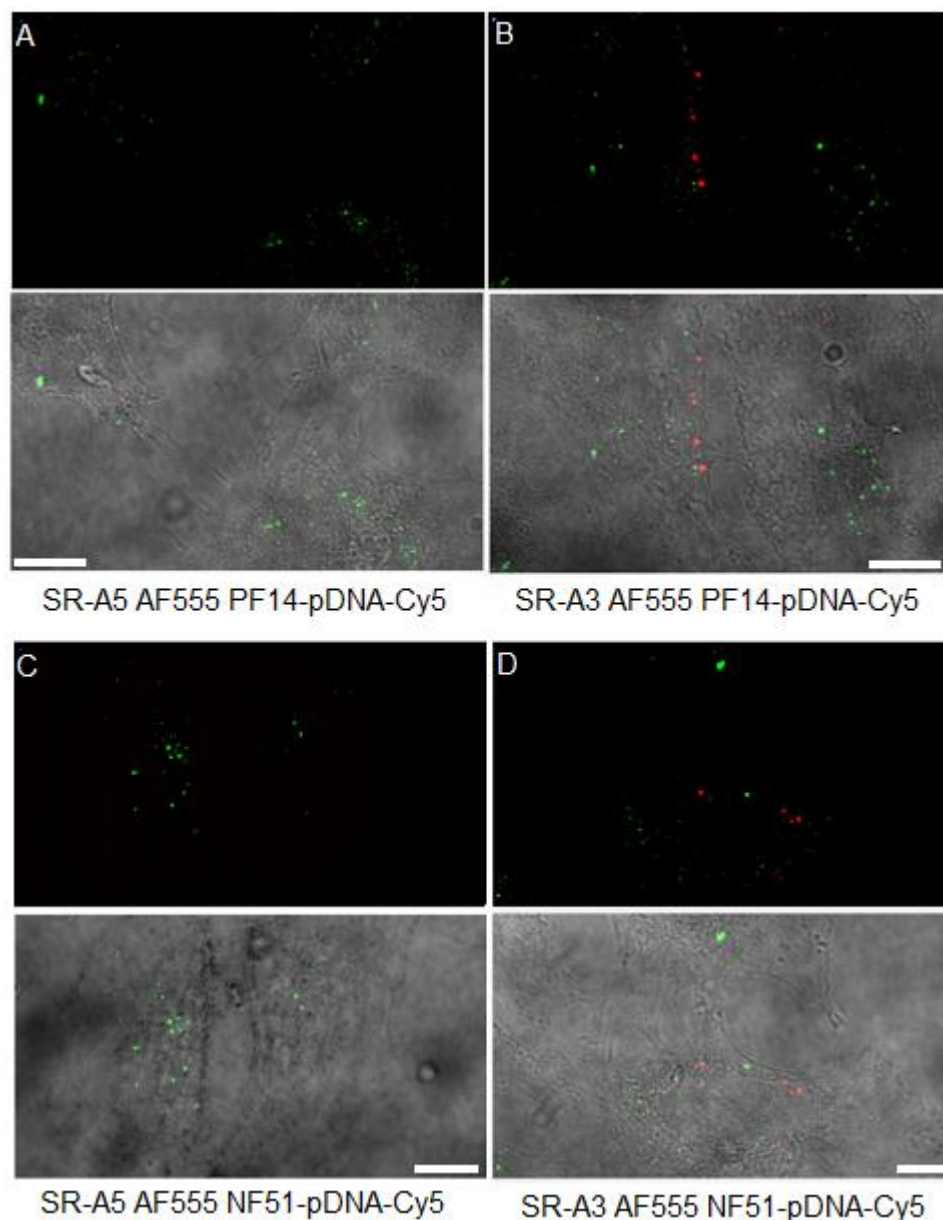
NF51 moodustab negatiivse pinnalaenguga komplekse pDNA-ga ja nagu PF14 on see teise põlvkonna RSP, mis on disainitud PF3 lähtudes. On teada, et negatiivse laenguga RSP-nukleiinhapete kompleksid kasutavad rakkudesse sisenemiseks SR-A retseptoreid (P. Arukuusk jt, 2013). HeLa rakkude inkubeerimine NF51-pDNA kompleksidega ja SR-A retseptorite detekteerimine, kasutades kaudset immunofluorestsentsmärgistamise meetodikat kinnitas, et nii SR-A5 kui SR-A3 retseptorid eksponeeritakse komplekside toimel HeLa rakkude pinnale (Joonis 3. C ja D). NF51-pDNA komplekside toimel suunatakse SR-A5 ja

SR-A3 retseptorid HeLa rakkude plasmamembraanile võrreldavas hulgas. Ainult peptiidi enese lisamisel söötmesse suunatakse samuti mõlemad retseptorid rakkude pinnale (Lisajoonis 1. C ja D). SR-A retseptorite transportimine rakkude pinnale peptiidi enese toime näitab, et just RSP käivitab kompleksi transportimise protsessi rakku.

2.3.2 SR-A retseptorite detekteerimine A549 rakkude pinnal pärast inkubeerimist RSP-pDNA nanokompleksidega

HeLa rakkudega saadud tulemused tekitasid küsimuse kas ka teised laialtkasutatavad rakuliinid rakendavad samu retseptoreid PF14-pDNA ja NF51-pDNA komplekside internaliseerimiseks, ning kas nende pinnale eksponeeritakse SR-A5 ja SR-A3 retseptoreid. Püstitatud küsimusele vastuse leidmiseks valiti A549 (inimese alveoolide basaalepiteeli adenokartsinoomi) rakuliin.

Esimesed katsed näitasid, et SR-A3 ja SR-A5 retseptorid praktiliselt puuduvad A549 rakkude pinnal ka pärast PF14-pDNA kompleksidega inkubeerimist. Sellepärast kontrolliti, kas vastavad nanokompleksid on üldse võimelised seostuma A549 rakkudega, kasutades Cy5-ga märgistatud pDNA-d. PF14-pDNA kompleksid siiski seostusid A549 rakkudega, ning nende pinnale eksponeeriti vähesel määral SR-A3 retseptoreid (Joonis 4.B). Üllatavalt SR-A5 retseptorid detekteeritavad ei olnud (Joonis 4.A). Rakkude inkubatsioon ainult PF14 sisaldavas söötmes andis analoogse tulemuse: SR-A3 eksponeeriti rakkude pinnal (Lisajoonis 2. B) aga SR-A5 retseptoreid mitte (Lisajoonis 2. A).



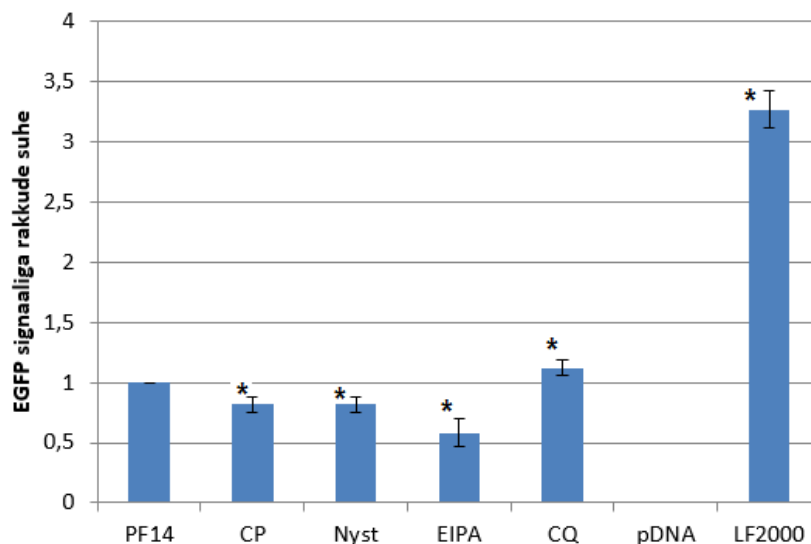
Joonis 4. Püüduretseptorite SR-A5 ja SR-A3 paiknemine A549 rakkude pinnal pärast inkubatsiooni RSP-pDNA kompleksidega. A. SR-A5 retseptorite paiknemine rakkude pinnal detekteerituna SCARA-5 antikehadega pärast inkubatsiooni PF14-pDNA kompleksidega. B. SR-A3 retseptorid tuvastatuna SCARA-3 antikehade ja vastavate sekundaarsete antikehadega pärast inkubatsiooni PF14-pDNA kompleksidega. C. SR-A5 retseptorite paiknemine plasmamembraanis pärast inkubatsiooni NF51-pDNA kompleksidega tuvastatuna vastava primaarse ja sekundaarse antikehadega. D. SR-A3 retseptorite tuvastamine SCARA-3 antikehade ja vastava sekundaarse antikehadega pärast inkubatsiooni NF51-pDNA kompleksidega. Sekundaarsed antikehad on märgistatud AlexaFluor 555-ga. pDNA on märgistatud Cy5-ga ja joonistel omab rohelist pseudovärvi. Mõõtlõik on 10 μ m.

Sarnaselt PF14-pDNA komplekside toimega näitas, A549 rakkude inkubeerimine NF51-pDNA-Cy5 komplekse sisaldavas söötmes, et plasmamembraanile transporditi väikeses koguses SR-A3 retseptoreid (Joonis 4. B) kuid SR-A5 retseptorid puuduvad raku pinnal (Joonis 4. A). Analoozne tulemus saadi ka inkubeerides A549 rakke NF51 peptiidi sisaldavas söötmes (Lisajoonis 2. C ja D), kus on näha SR-A3, kuid SR-A5 retseptorid puuduvad. HeLa rakkudes nähtust oluliselt erinevad tulemused omakorda tekitasid küsimuse, kas SR-A5

retseptoreid ei suunata rakkude pinnale, seda valku ei ekspresseerita A549 rakuliinis või ei ole retseptorid tuvastatavad kasutatud SCARA-5 antikehadega. SR-A5 ekspressiooni kontrollimine permeabiliseeritud A549 rakkudes näitas, et rakud ekspresseerivad SR-A3 retseptoreid, kuid mitte SR-A5 (Lisajoonis 3). Saadud tulemused näitavad, et PF14-pDNA ja NF51-pDNA komplekside juuresolekul käitub A549 rakuliin sarnaselt HeLa rakuliiniga suunates SR-A3 retseptori plasmamembraani. SR-A5 detekteerimine ei andnud tulemusi, mis viitab sellele, et need retseptorid A549 rakkudes puuduvad või ei ole tuvastavad kasutatud primaarsete antikehadega.

2.3.3 PF14-pDNA komplekside endotsütoosimehhanismide analüüs HeLa rakkudes

K. Ezzat jt näitasid, et PF14-SKO kompleksid kasutavad endotsütoosi rakkudesse sisenemiseks (K. Ezzat jt, 2013). P. Arukuusk omakorda näitas farmakoloogiliste inhibiitorite abil, et NF51-pDNA kompleksid kasutavad HeLa rakkudesse sisenemiseks ainult makropinotsütoosi. Kuna need tulemused väljendasid kogu rakupopulatsiooni käitumist ega ei võimaldanud hinnata transfekteeeritud rakkude hulka populatsioonis (P. Arukuusk jt, 2013), rakendati käesolevas töös FACS ja CLSM analüüsi. Endotsütoosi mehhanismide analüüsimiseks kasutati järgmisi inhibiitoreid: EIPA-t et inhibeerida makropinotsütoosi, klatriin-vahendatud endotsütoosi inhibeerimiseks kloropromasiini ning kaveoliin-vahendatud endotsütoos inhibeeriti nüstatiiniga. Inhibiitorite juuresolekul teostati 4 tunnine transfektsioon PF14-pDNA kompleksidega, mis sisaldasid EGFP kodeerivat plasmidi, ning 24 tundi hiljem rakud analüüsiti läbivoolu tsütomeetria (FACS) abil. Alternatiivse transfektsioonireagendina kasutati *Lipofectamine 2000* (LF2000). Joonis 5 näitab FACS-i tulemusi, mis on normeeritud ilma inhibiitoriteta PF14-pDNA kompleksi transfekteeeritud proovi suhtes. EIPA juuresolekul vähenes PF14-pDNA komplekside transfektsiooni efektiivsus keskmiselt 40% võrra, nüstatiini ja kloorpromasiini lisamine alandas transfektsiooni umbes 20% võrra. Klorokviini lisamine suurendas transfekteeerunud rakkude hulka, sest ta aitab komplekside endosoomidest vabaneda. Tugev transfektsiooni inhibeerimine EIPA juuresolekul näitab, et makropinotsütoos on peamine rada mille abil PF14-pDNA komplekse endotsüteeritakse. Kaveoliin- ja klatriin-vahendatud endotsütoosi radu kasutatakse osaliselt vastavate komplekside transportimiseks rakkudesse. Tulemused näitavad, et PF14-pDNA kompleksid kasutavad samu endotsütoosi teid nagu PF14-SKO (C. Juks jt, 2015).

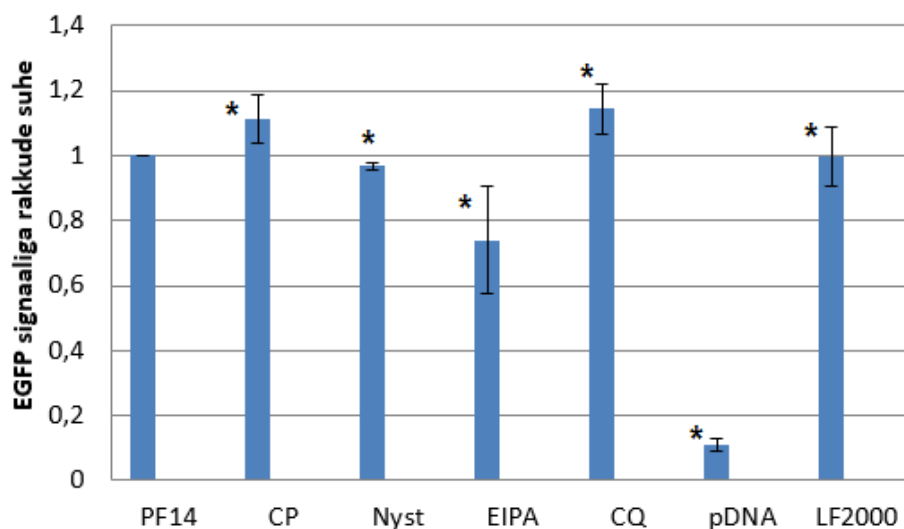


Joonis 5. PF14-pDNA komplekside endotsütoosimehhanismide analüüs HeLa rakkudes. Rakke inkubeeriti endotsütoosi inhibeerimiseks vastavalt kloorpromasini (CP), nüstatini (Nyst), EIPA-ga 30 min ja transfekeeriti PF14-pDNA kompleksidega (1µM PF14, 500ng pDNA) 4 tundi. EGFP ekspresseerivate rakkude arvu hinnati 24 tunni möödudes FACS-iga. Klorokviini (CQ) kasutati komplekside vabastamiseks endosoomidest. T-test: * $p < 0.05$

2.3.4 PF14-pDNA komplekside endotsütoosimehhanismide analüüs A549 rakkudes

Teades, et HeLa rakkudes suur osa PF14-pDNA komplekse endotsüteeritakse makropinotsütoosi abil tekkis küsimus, kas ka teistes rakuliinides kasutavad RSP-pDNA kompleksid samu mehhanisme. A549 rakuliinis, mis on raskesti transfekeeritav, kasutati samu inhibiitoreid ja teostati 4 tunnine transfektsioon PF14-pDNA EGFP kodeerivate kompleksidega ning 24 tunni pärast analüüsiti EGFP ekspressiooni FACS-i abil. Saadud tulemusi normeeriti inhibiitoriteta teostatud transfektsiooni tulemuste suhtes. Ka A549 rakkudes pärssis ekspressiooni kõige tugevamalt EIPA, mis vähendas transfektsiooni efektiivsust 30% võrra, mis näitab, et makropinotsütoos on peamine komplekside rakkudesse transpordi mehhanism. Nüstatini lisamine mõjutas transfektsiooni vähem ja EGFP signaaliga rakkude hulk oli umbes 5% väiksem võrreldes ilma inhibiitoriteta prooviga, mis näitab, et väike osa kompleksidest transporditakse rakkudesse kaveoliin-vahendatud endotsütoosi abil. Kloorpromasiin ja klorokviin mõjusid transfektsioonile positiivselt ning tõstsid komplekside efektiivsust keskmiselt 10% võrra. Transfektsiooni efektiivsuse suurenemine klorokviini abil on loogiline, kuna see aitab kompleksidel endosoomidest väljuda. Kloorpromasiini soodustavat mõju transfektsioonile võiks seletada sellega, et selle tee blokeerimine suunab rohkem komplekse endotsütoosiradadesse, mis võimaldavad rakke transfekeerida ja see suurendas markervalgu ekspressiooni. Tähelepanuväärselt on see, et LF2000 ja PF14-pDNA proovid omasid sarnaseid tulemusi ning transfektsioon PF14 ja LF2000 kasutamisega A549

on võrdne. A549 rakuliinis saadud tulemused, näitasid, et PF14-pDNA komplekse transporditakse ka neisse rakkudesse peamiselt makropinotsütoosi abil.

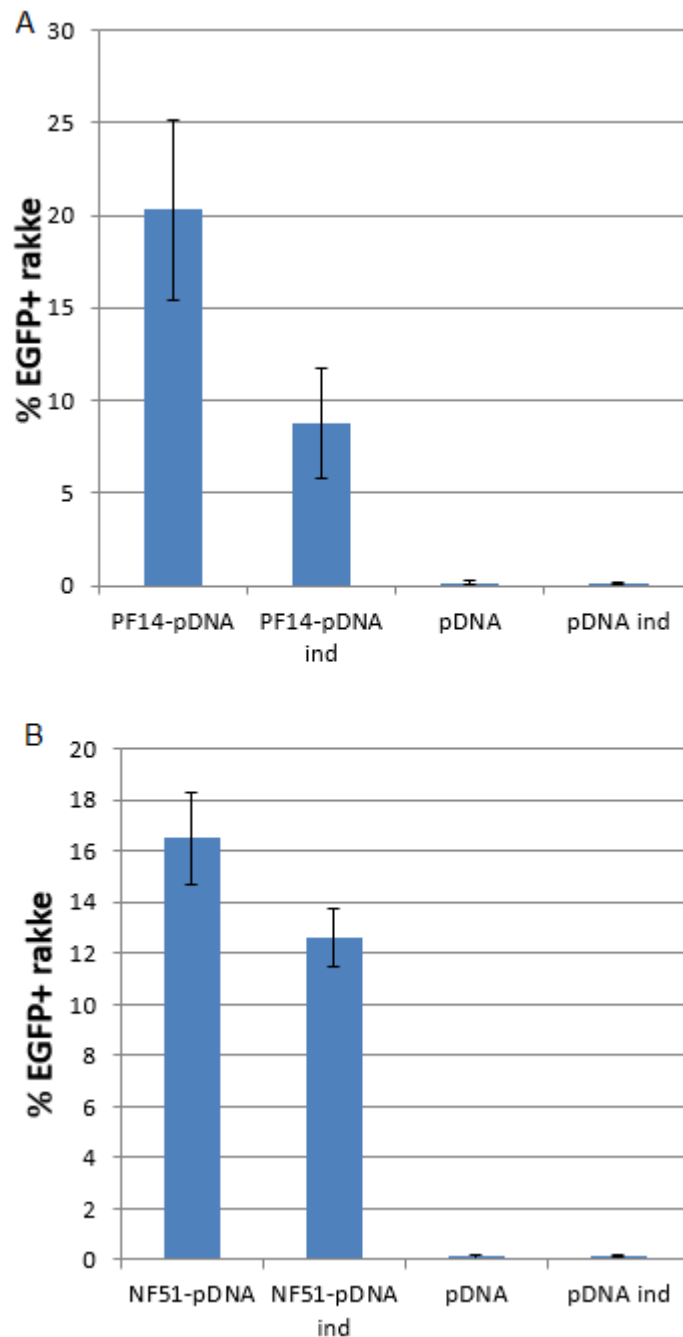


Joonis 6. PF14-pDNA komplekside endotsütoosimehhanismide analüüs A549 rakkudes. Rakke inkubeeriti endotsütoosi inhibeerimiseks vastavalt kloorpromasini (CP), nüstatini (Nyst), EIPA-ga 30 min ja transfekeeriti PF14-pDNA kompleksidega (1 μ M PF14, 500ng pDNA) 4 tundi. EGFP ekspresseerivate rakkude arvu hinnati 24 tunni möödudes FACS-iga. Klorokviini (CQ) kasutati komplekside vabastamiseks endosoomidest. T-test: * $p < 0.05$

2.3.5 SR-A retseptorite plasmamembraani suunamise indutseerimine RSP-dega suurendamaks komplekside transfektsiooni efektiivsust HeLa rakkudes

Teades, et SR-A ülesekspressioon tõstab komplekside efektiivsust (S. Lindberg jt, 2015) ning PF14 ja NF51 juuresolekul rakud eksponeerivad SR-A retseptoreid plasmamembraanile püstitati hüpotees, et rakkude inkubeerimine PF14 või NF51 sisaldavas söötmes enne komplekside lisamist võib tõsta transfektsiooni efektiivsust, kuna mõlemad RSP-d käivitavad SR-A3 ja SR-A5 retseptorite eksponeerimist raku plasmamembraani pinnale. Selle hüpoteesi kontrollimiseks tehti paralleelselt kaks erinevat transfektsiooni. Esimeses transfektsioonis, enne komplekside lisamist rakud inkubeeriti 1 tund vastava RSP-ga. Teises transfektsioonis rakkudele lisati ainult RSP-pDNA kompleksid. Kasutatud pDNA kodeeris EGFP-d, mis võimaldas proove analüüsida FACS-i abil. Proove inkubeeriti kompleksidega 1 tund ning 24 tunni pärast rakud analüüsiti FACS-i abil. PF14-pDNA kompleksidega inkubeerimine põhjustas 20% HeLa rakkudes EGFP ekspressiooni (Joonis 7. A). HeLa rakkude inkubeerimine enne komplekside lisamist 1 μ M PF14 peptiidi sisaldavas keskkonnas vähendas PF14-pDNA komplekside transfektsiooni keskmiselt 50% võrra võrreldes rakkudega millele keskonda olid lisatud ainult PF14-pDNA kompleksid. Selline erinevus näitab, et SR-A retseptorite plasmamembraani suunamise indutseerimine PF14

peptiidiga omab negatiivset efekti transfektsioonile. See võib olla seotud sellega, et PF14 ja PF14-pDNA kompleksid konkureerivad omavahel ühtede ja samade SR-A retseptorite pärast. Rakkudes, mille keskkonda lisati ainult pDNA, vaatamata sellele, kas nad oli või ei olnud enne seda inkubeeritud PF14 sisaldavas söötmes, EGFP signaal praktiliselt puudus, kuna plasmiid ise ei suuda läbida rakuplasma membraani ega ka efektiivselt SR-A-dega seonduda.



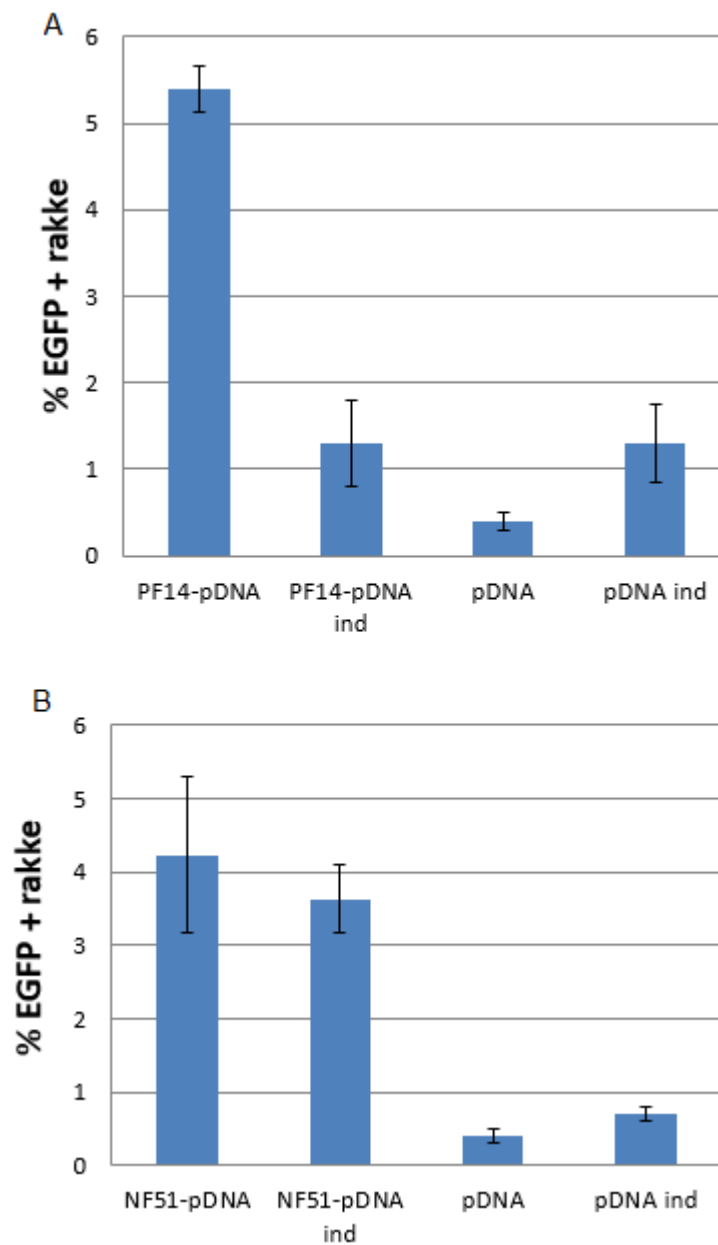
Joonis 7. SR-A plasmamembraani suunamise indutseerimine HeLa rakkudes PF14 või NF51-ga transfektsiooni efektiivsuse tõstmiseks. A. SR-A retseptorid indutseeriti rakkude pinnale inkubatsiooniga 1 μ M PF14 sisaldavas söötmes ning tansfekteeriti PF14-pDNA kompleksidega 1 tunni jooksul. B. SR-A retseptorid indutseeriti rakkude pinnale inkubatsiooniga 1 μ M NF51 sisaldavas söötmes ning tansfekteeriti NF51-pDNA kompleksidega 1 tunni jooksul. EGFP fluorestsents mõõdeti 24 tunni pärast transfektsiooni, kasutades FACS-i. Retseptorite indutseerimine mõlema peptiidiga omab negatiivset efekti ja vähendab RSP-pDNA komplekside transfektsiooni efektiivsust.

HeLa rakkudes SR-A retseptorite plasmamembraani suunamise indutseerimine 1 μ M NF51-ga andis analoogsed tulemused (Joonis 7. B). „Indutseeritud“ SR-A retseptoritega rakkude inkubatsioon NF51-pDNA juuresolekul näitas komplekside efektiivsuse vähenemist 20% võrra. NF51-pDNA komplekside efektiivsuse vähenemine võib olla samuti põhjustatud sellest, et NF51 ja kompleks konkureerivad omavahel. Kui võrrelda aga ainult komplekside transfektsiooni efektiivsust, siis PF14-pDNA ja NF51-pDNA kompleksid transfekteerisid HeLa rakke suhteliselt samaväärse efektiivsusega. Kuigi PF14-pDNA komplekside efektiivsuse keskmine väärtus on suurem, on ka tulemuste hajuvus suurem, mis võrdsustab NF51 ja PF14 komplekside transfektsiooni efektiivsused. PF14 komplekse mõjutab „indutseerimine“ väga tugevalt, vähendades transfektsiooni, NF51 – minimaalselt.

2.3.6 SR-A retseptorite plasmamembraani suunamise indutseerimine RSP-dega suurendamaks komplekside transfektsiooni efektiivsust A549 rakkudes

Et kontrollida, kas SR-A-de rakupinnale suunamine RSP-dega vähendab RSP-pDNA nanokomplekside transformatsiooni efektiivsust ka teistes rakuliinides, viidi analoogne katse lisaks HeLa rakkudele läbi ka A549 rakkudes. Vastavalt eeldatule, omas SR-A retseptorite plasmamembraani suunamise indutseerimine A549 rakkudes samuti negatiivset efekti ja tendents jääb samaks HeLa rakkudes täheldatuga. PF14-pDNA kompleksid toimivad efektiivsemalt „indutseerimata“ A549 rakkudes ja „indutseeritud“ rakkudes antud kompleksi efektiivsus on tugevasti vähenenud (Joonis 8, A). NF51 kasutamine SR-A retseptorite transpordi indutseerimiseks samuti vähendab NF51-pDNA komplekside efektiivsust. Joonisel 8B, on näha et NF51-pDNA kompleksid transfekteerivad paremini indutseerimata retseptoritega rakke ja EGFP signaaliga rakkude hulk proovis on 20% kõrgem võrreldes prooviga mille rakud olid enne inkubeeritud NF51 sisaldavas keskkonnas. Erinevalt HeLa-st, nii NF51 kui ka PF14 indutseerisid plasmiidse DNA transporti ja EGFP ekspressiooni A549 rakkudes. Võib arvata, et osa RSP-st jääb A549 rakkude pinnale ning pärast söötme vahetust ja plasmidi lisamist on see võimeline moodustuma komplekse pDNA-ga ning neid transporditakse rakkude sisse.

Üllatuslikult ekspresseeris ainult väga väike hulk A549 rakke EGFP-d pärast inkubeerimist PF14-pDNA ja NF51-pDNA kompleksidega. Võiks eeldada et mõlemad nii SR-A3 kui SR-A5 on olulised et RSP-pDNA kompleksid siseneksid rakkudesse. Teades aga, et A549 rakkudes SR-A5 retseptorid ei olnud detekteeritavad, võib see olla põhjuseks, miks EGFP signaaliga rakkude hulk on nii väike.



Joonis 8. SR-A plasmamembraani suunamise indutseerimine A549 rakkudes PF14 või NF51-ga transfektsiooni efektiivsuse tõstmiseks. A. SR-A retseptorid indutseeriti rakkude pinnale inkubatsiooniga 1 μ M PF14 sisaldavas söötmes ning tansfekteeriti PF14-pDNA kompleksidega 1 tunni jooksul. B. SR-A retseptorid indutseeriti rakkude pinnale inkubatsiooniga 1 μ M NF51 sisaldavas söötmes ning tansfekteeriti NF51-pDNA kompleksidega 1 tunni jooksul. EGFP fluorestsents mõõdeti 24 tunni pärast transfektsiooni, kasutades FACS-i. Retseptorite indutseerimine mõlema peptiidiga omab negatiivset efekti ja vähendab RSP-pDNA komplekside transfektsiooni efektiivsust

2.4 Arutelu

Käesolevas töös uuriti SR-A3 ja SR-A5 retseptorite suunamist PF14-pDNA ja NF51-pDNA komplekside toimel tsütoplasma membraanestest struktuuridest HeLa ja A549 rakkude plasmamembraanile. Samuti analüüsiti missuguste endotsütoosi radade kaudu PF14-pDNA kompleksid transporditakse rakkudesse. Lisaks uuriti vastavate komplekside transfektsiooni efektiivsust HeLa ja A549 rakuliinides pDNA-lt markervalgu ekspressiooni alusel ja prooviti seda tõsta indutseerides SR-A retseptorite suunamist plasmamembraani RSP-de abil.

PF14 ja NF51 on teise põlvkonna RSP-d, mis on disainitud transportvektoritena terapeutiliste bioaktiivsetele molekulide jaoks. Mõlemad RSP-d suudavad moodustada komplekse SKO, pDNA ja siRNA-ga elektrostaatiliste ja hüdrofoobsete interaktsioonide tulemusena (K. Ezzat jt, 2012) (K-L. Veiman jt, 2013) (P. Artukuusk jt, 2013). On näidatud ka, et saadud kompleksid suudavad efektiivselt siseneda erinevates rakkudesse. Komplekside omaduste kirjeldamisel selgus, et need on negatiivselt laetud, ning rakkudesse sisenemiseks vajavad need klass A püüdurretseptoreid (K. Ezzat jt, 2012).

Rakkude sisenemiseks vajavad negatiivselt laetud PF14-SKO kompleksid SR-A retseptoreid (K. Ezzat jt, 2012). Teades, et HeLa rakkudes on klass A püüdurretseptoritest olemas ainult SR-A3 ja SR-A5 ning võttes arvesse, et PF14-pDNA kompleksid samuti omavad negatiivset laengu (K-L. Veiman jt, 2013), püstitasime hüpoteesi, et PF14-pDNA komplekside rakku sisenemiseks eksponeeritakse plasmamembraanile ülalmainitud SR-A retseptoreid. Töö tulemused näitasid, et PF14-pDNA komplekside olemasolu HeLa koekultuuri söötmes tõepoolest põhjustab SR-A3 ja SR-A5 retseptorite eksponeerimist rakku pinnale. Analoogselt ka NF51-pDNA kompleksid indutseerisid SR-A3 ja SR-A5 suunamist rakusisestest membraanidest plasmamembraanile HeLa rakkudes. Saadud tulemused on väga heas kooskõlas S. Lindberg jt, tööga, kus näidati, et SR-A retseptorid on olulised RSP-pDNA komplekside sisenemiseks rakkudesse ning P. Arukuusk jt, tööga näidati et SR-A retseptorite inhibeerimine vähendab NF51 komplekside efektiivsust. (P. Arukuusk jt, 2013)(S. Lindberg jt, 2015). Edasi laiendati esialgset hüpoteesi, et ka teistes rakuliinides põhjustavad PF14-pDNA ja NF51-pDNA kompleksid SR-A3 ja SR-A5 transpordi rakkude pinnale ning kompleksid vajavad neid retseptoreid rakku sisenemiseks.

Hüpoteesi testimiseks valiti A549 rakuliin ning analoogsed katsed näitasid, et ainult SR-A3 retseptorid transporditakse nende rakkude pinnale. Seetõttu vajas selgitamist miks SR-A5 puuduvad nendes rakkudes või see hüpotees ei kehti. SR-A5 retseptorite tuvastamine permeabeliseeritud A549 rakkudes näitas, et vastav retseptorvalk puudub või neid on nii vähe,

et ei ole võimalik korralikult detekteerida. A549 on rakuliin, mis on saadud bronhoalveolaarse epiteeli tuumorst (BET). Dieudonné näitas oma töös RT-PCR-iga, et BET rakkudes puuduvad SR-A1 ja SR-A5 retseptorid, aga SR-A3 on nõrgalt ekspresseeritud (A. Dieudonné jt, 2012). Lisaks sellele Human Protein Atlas andmebaas näitab, et BET rakkudes SR-A5 retseptorid puuduvad või on ekspresseeritud minimaalselt. PF14-pDNA ja NF51-pDNA kompleksid põhjustavad SR-A retseptorite pinnale tulekut ka teistes rakuliinides lisaks HeLa-le, kui sellised retseptorid on rakkudes ekspresseeritud.

Komplekside efektiivsus siseneda erinevate tüüpi rakkudesse on väga oluline. Antud töös teostatud katsete alusel on näha, et PF14-pDNA kompleksid suudavad transfekteerida nii HeLa kui A549 rakke natuke paremini võrreldes NF51-pDNA kompleksidega, kuid erinevus ei ole statistiliselt oluline. Oletus, et SR-A retseptorite plasmamembraani suunamise indutseerimine 1µM PF14 või NF51 peptiididega enne komplekside lisamist võib tõsta komplekside efektiivsust, osutus valeks. Tulemused näitavad, et selline inkubatsioon just vastupidi vähendab komplekside võimet viia pDNA nii HeLa kui ka A549 rakkudesse. Mõlemas rakuliinis olid PF14-pDNA kompleksid indutseeritud SR-A retseptoritega rakkudes 60% võrra vähem efektiivsed kui RSP-dega mõjutamata rakkudes. Samal ajal NF51-pDNA kompleksid näitavad umbes 20% vähenemist efektiivsuses. Üheks võimaluseks selle erinevusi seletamiseks on võimalus, et PF14 ja NF51 initsieerivad erineval määral või erinevas vahekorras SR-A3 ja SR-A5 suunamist plasmamembraanile. Teiseks PF14 ja NF51 ning nende kompleksid nukleiinhapetega võivad konkureerida omavahel erineva efektiivsusega, et seonduda retseptoritega. Lindberg koos kolleegidega näitas, et SR-A retseptorid seovad efektiivselt PF14, mis vähendab PF14-pDNA komplekside võimalust interakteeruda SR-A retseptoritega (S. Lindberg jt, 2015). Antud töö tulemused viitavad, et NF51 võib vähem efektiivselt seostuda SR-A3 ja SR-A5 ning nõrgemini konkureerida pDNA kompleksidega.

A549 rakkude transfektsiooni tulemused näitasid, et nii PF14 kui ka NF51 kompleksid pDNA-ga ei suuda efektiivselt siseneda nendesse rakkudesse. Oma katsetes me SR-A5 retseptoreid selles rakuliinis ei detekteerinud, mis võiks seletada komplekside madalat efektiivsust. See kinnitub ka varem kirjeldatud, et SR-A retseptorite maha reguleerimine vähendab transfektsiooni efektiivsust (K. Ezzat jt, 2012) (S. Lindberg jt, 2015). Seega kui SR-A5 retseptor puudub rakuliinis, siis ei tasu oodata efektiivset transfektsiooni. Retseptorite plasmamembraani suunamise indutseerimine peptiididega A549 rakuliinis enne komplekside lisamist vähendas transfektsiooni efektiivsust nagu HeLa rakkudes. Võrreldes HeLa rakkudega jäi efekt samaks, PF14-pDNA kompleksid kaotasid umbes 60% oma efektiivsusest aga NF51-pDNA komplekside sisenemine rakkudesse vähenes keskmiselt 20% võrra. See

näitab, et protsessid, mis toimuvad HeLa ja A549 rakkudes ja mille tõttu transfektsioon väheneb on tõenäoliselt mõlemas rakuliinis samad ja arvatavasti tingitud RSP ja kompleksi konkurentsist seondumiseks SR-A-dega.

Üks olulisematest aspektidest on kuidas toimub RSP-pDNA komplekside transport. Ezzat näitas, et PF14-SKO kompleksid kasutavad aktiivset transporti rakkudesse saamiseks (K. Ezzat jt, 2012). C. Juks omakorda näitas, et farmakoloogilistest endotsütoosi inhibiitoritest kõige rohkem mõjutas PF14-SKO komplekside efektiivsust makropinotsütoosi inhibiitor (C. Juks jt, 2015). Vastavalt sellele kontrolliti milliseid mehhanisme PF14-pDNA kompleksid kasutavad rakkudesse sisenemiseks. Arukuusk koos kolleegidega näitas, et NF51-pDNA kompleksid kasutavad ainult makropinotsütoosi HeLa rakkudesse internaliseerumiseks (P. Arukuusk jt, 2013). Ka käesolevas töös leiti, et HeLa rakkudes on makropinotsütoos põhiline mehhanism PF14-pDNA komplekside endotsüteerimiseks, ning klatriin- ja kaveoliin-vahendatud endotsütoosi rajad võtavad minimaalset osa komplekside internaliseerumisest. See tulemus näitab, et PF14-pDNA endotsüteeritakse sarnaselt PF14-SKO kompleksidega, mis tõenäoliselt tuleneb nende sarnastest omadustest (C. Juks jt, 2015). Vaatamata sellele, et RSP-pDNA kompleksid transfekteerisid A549 rakke suhteliselt madala efektiivsusega, oli ka selles rakuliinis makropinotsütoos peamine mehhanism mille abil endotsüteeritakse komplekse. Kokkuvõtvalt on RSP-pDNA komplekside endotsütoos nii HeLa kui A549 rakkudes analoogne PF14-SKO internaliseerimise mehhanismidega (C. Juks jt, 2015).

Fakt, et SR-A retseptorid on olulised eksogeensete nukleiinhapete transportimiseks imetajarakkudesse RSP-de ja polükatioonide abil tõstab küsimuse, kuidas transfekteerida rakke, mis ei oma SR-A retseptoreid. Tõenäoliselt osalevad nukleiinhapete transpordil rakku ka teiste klasside püüdurreseptorid, näiteks SR-B ja SR-A1 sfääriliste nukleiinhapete korral (C.H.J. Choi jt, 2013) ning retseptorid teistest perekondadest, näiteks „toll-like-receptor“ (TLR) superperekonnast. TLR7 ja TLR8 retseptorid osalevad „lipiidid“ nanopartiklite transportimises, mida kasutatakse siRNA viimiseks rakkudesse (A. Akinc jt, 2009) (D.N. Nyugen jt, 2013).

KOKKUVÕTE

Rakku sisenevate peptiidide (RSP, CPP) avastamine ning nende rakendatavus erinevate bioloogiliselt aktiivsete makromolekulide transpordil rakkudes nii *in vitro* kui *in vivo* tingimustes, on muutnud RSP-d väga perspektiivikateks ravimikandjateks. Lihtne mittekovalentsete komplekside moodustamise geeniekspressiooni mõjutavate nukleiinhapetega (NH) nagu siRNA, SKO, pDNA jt, ning saadud nanopartiklite aktiivsus, suurendavad veel RSP-de potentsiaali. Uued, teise põlvkonna RSPd nagu PF14 ja NF51 on võimelised efektiivselt sisestama rakkudesse NH-d nii *in vitro* kui *in vivo* ning nende toksilisus on oluliselt madalam kui kommertsiaalsetel lipofektsiooni reagentidel. Samas on oluline mõista mehhanisme kuidas RSPde kompleksid transfekteevad rakke ja missugused endotsütoosiradu kasutatakse. Hiljuti avastati, et püüdurretseptorid (scavenger receptors) SR-A3 ja SR-A5 on vajalikud komplekside transpordiks rakkudesse ning kasutatakse mitmeid erinevaid endotsütoosi mehhanisme. Samas erinevad RSP-d kasutavad rakkudesse sisenemiseks erinevaid endotsütootilisi mehhanisme, ning lastmolekulid mõjutavad seda erinevalt. Seetõttu on oluline selgitada konkreetse RSP-lastmolekuli kombinatsiooni korral, kas kasutatud rakuliine mehhanism säilitab ka lastmolekuli aktiivsuse rakkudes.

Käesolevas töös uuriti RSP-pDNA komplekside võimet transfekteevada HeLa ja A549 rakke, kasutades moodustatud PF14 ja NF51 ning lastmolekulina plasmiidset DNA. Töö eesmärgiks oli selgitada, kas komplekside olemasolu raku söötmes põhjustab püüdurretseptorite SR-A3 ja SR-A5 eksponeerimist plasmamembraanile erinevates rakuliinides. Võrreldi ka komplekside transfektsiooni efektiivsust erinevates rakkudes ning uuriti võimalusi antud protsessi paranemiseks. Lisaks selgitati missuguseid endotsütoosi mehhanisme kasutades viiakse kompleksid rakkudesse.

Kokkuvõtvalt katsete tulemused näitasid, et:

1. PF14-pDNA ja NF51-pDNA komplekside olemasolu raku söötmes põhjustab püüdurretseptorite SR-A3 ja SR-A5 suunamise plasmamembraanile HeLa rakkudes. A549 rakkudes pinnale eksponeeritakse ainult SR-A3 retseptorid ja neidki väikses koguses. Edasine uuring näitas, et A549 rakkudes ei ekspresseerita SR-A5 retseptoreid.
2. Mõlema RSP-ga formeeritud pDNA kompleksid on võimelised efektiivselt transfekteevada HeLa rakke ning väiksema efektiivsusega A549 rakke. Arvestades, et A549 rakkudes SR-A5 puudub võiv pidada antud retseptorit oluliseks komplekside rakkude sisenemisel.

3. Oletus, et rakkude inkubeerimine RSP-dega enne transfektsiooni RSP-dNA kompleksidega võiks tõsta transfektsiooni efektiivsust, ei kinnitunud. PF14-pDNA komplekside võime transfekteerida nii HeLa kui A549 rakke langes oluliselt kui rakke oli eelnevalt inkubeeritud PF14-ga SR-A-de transpordi indutseerimiseks plasmamembraanile. Analoozne tulemus saadi ka NF51-pDNA kompleksidega, kuid erinevus oli väike.
4. Endotsütoosi mehhanismide analüüs inhibiitorite kasutades inhibiitoreid näitas, et transfektsioon väheneb oluliselt makropinotsütoosi inhibiitori juuresolekul nii HeLa kui A549 rakkudes. Kaveoliin vahendatud endotsütoosi inhibiitor samuti vähendab transfektsiooni efektiivsust, kuid vähemal määral. See näitab, et makropinotsütoos on põhiline PF14 komplekside rakkudesse transpordi mehhanism.

SUMMARY

Regulation of SR-A receptors` localization during pDNA transport with PF and NF type cell penetrating peptides.

Cell penetrating peptides (CPP) are short peptides with the length ranging from 5 to 40 amino acids, with ability to induce their uptake into cells and to deliver bioactive macromolecules such as plasmid DNA, siRNA, splicing correcting oligonucleotides, protein. The ability to transport other molecules made CPP a promising tool for *in vivo* delivery and an object of intense research. Three different CPP classes can be distinguished based on their origin: protein derived, chimeric and synthetic. Protein derived peptides are those that were found in naturally occurring peptide sequences, such as TAT and Penetratin. Chimeric peptides typically combine the properties of synthetic and protein-derived peptides, consisting of fragments from naturally occurring proteins. A perfect example is transportan that consists of galanin fragment and mastoparan. Synthetic CPPs are designed peptides with CPP properties such as Nona-arginine, MAP and others. Cargo molecules can be attached to CPP covalently via chemical bond or non-covalently harnessing mostly the electrostatic and hydrophobic interactions between CPP and cargo molecules, leading to CPP-cargo complex formation. Nowadays lots of different systems have been developed that use CPPs for *in vivo* and *in vitro* delivery of bioactive cargoes. However, CPPs have their limitations like in delivery efficiency, specificity and toxicity that must be overcome. Another obstacle lies in incomplete understanding how CPP-cargo constructs get inside cells, which endocytic pathways they use, and whether the specific receptors mediate the uptake of complexes by cells. Recently, it was shown that class A Scavenger receptors (SR-A) are involved in internalization of negatively charged CPP-cargo complexes, and that up- and downregulation of SR-As greatly affects the internalization process.

In this work we used two second-generation CPPs PepFect14 (PF14) and NickFect51 (NF51) that are able to form non-covalent complexes with plasmid DNA (CPP-pDNA). The aims of the study were: to analyze whether SR-A3 and SR-A5 are recruited to the plasma membrane when cells are treated with PF14-pDNA or NF51-DNA complexes; to clarify which endocytic pathways are used to transport these complexes into cells; and to examine, whether it is possible to enhance uptake of complexes into cells.

Results of the experiments showed that:

1. Presence of PF14-pDNA or NF51-pDNA complexes and the respective CPPs induces recruitment of SR-A3 and SR-A5 receptors to the surface of HeLa and A549 cells. On the surface of A549 cells only SR-A3 receptors were detected in the presence of PF14-pDNA or NF51-pDNA complexes and CPPs. Immunofluorescence analysis of A549 cells showed that they lack SR-A5 receptors.
2. Both the PF14 and NF51-containing complexes were able to effectively deliver pDNA into HeLa cells. A549 cells transfection rates were lower than of HeLa cells which shows that SR-A5 receptors are also required for the internalization of complexes
3. The assumption that incubation of cells with the respective CPPs before transfection will increase the efficiency of complexes internalization and biological read-out, was disproved. Such incubation reduced the activity of PF14-pDNA complexes in both cell lines. Negative effect was also observed with NF51-pDNA complexes but it was relatively small.
4. Experiments using different inhibitors of endocytic pathways showed that in both cell lines macropinocytosis is primarily used for the uptake of PF14-pDNA complexes into cells. Inhibitors of clathrin- and caveolin-mediated endocytosis also decreased the transfection of cells by PF14-pDNA complexes but reduction was less prominent.

TÄNUAVALDUSED

Täna oma juhendajaid Helerin Margust ja professor Margus Poogat, kes andsid võimaluse teha tööd selles põnevas valdkonnas ja abi töö valmimisel. Täna Carmen Juksi heade teooria selgituste ja abi eest. Täna Janely Paed ja Annely Lorentsi heade nõuannete ja asjalike küsimuste eest. Täna tänada ka Dmitri Lubenetsi, kes aitas teha FACS-i analüüse.

KASUTATUD KIRJANDUS

A. Artiklid

Andaloussi, S., Lehto, T., Mäger I., jt (2011) Design of a peptide-based vector, PepFect6, for efficient delivery of siRNA in cell culture and systemically in vivo. *Nucleic Acids Research*, 39:3972–3987

Arukuusk, P., Pärnaste, L., Oskolkov N., jt (2013) New generation of efficient peptide-based vectors, NickFects, for the delivery of nucleic acids. *Biochim Biophys Acta*, 1828:1365–1373

Arukuusk, P., Pärnaste, L., Margus, H., jt (2013) Differential endosomal pathways for radically modified peptide vectors. *Biocon. Chem*, 24:1721–1732

Ben, J., Zhu, X., Zhang H., Chen Q., (2015) Class A1 scavenger receptors in cardiovascular diseases. *British Journal of Pharmacology* 172:5523–5530

Brown, M., S., Goldstein J., L., (1979) Receptor-mediated endocytosis: insight from the lipoprotein receptor system. *Proc Natl Acad Sci* 76:3330–3337

Bucci, M., Gratton, J.P., Rudic, R.D., jt (2000) In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation. *Nat Med*. 6:1362–1367

Cerrato, C., P., Lehto, T., Langel, Ü., (2014) Peptide-based vectors: recent developments. *BioMol Concepts* 5:479–488

Dieudonné, A., Torres, D., Blanchard, S., jt (2012) Scavenger Receptors in Human Airway Epithelial Cells: Role in Response to Double-Stranded RNA. *PlosOne*. 7:e41952

Doi, T., Higashino, K., Kurihara, Y., jt (1993) Charged collagen structure mediates the recognition of negatively charged macromolecules by macrophage scavenger receptors. *J Biol Chem*. 268:2126–2133

Ezzat, K., Andaloussi, S., Zaghloul, E., M., jt (2011) PepFect 14, a novel cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery in solution and as solid formulation. *Nucleic Acids Research*, 12:5284–5298

Ezzat, K., Zaghloul, E., M., Andaloussi, S., jt (2012) Solid formulation of cell-penetrating peptide nanocomplexes with siRNA and their stability in simulated gastric conditions. *J Controlled Release* 162:1–8

Eriste, E., Kurrikoff, K., Suhorutsenko, J., jt (2013) Peptide-based glioma-targeted drug delivery vector gHoPe2. *Bioconjug. Chem.* 24:305–313

Falcone, S., Cocucci, E., Podini, P., jt (2006). Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *Journal of Cell Science.* 119:4758–69.

Fawell, S., Seery, J., Daikh, Y., jt (1994) Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Cell Biology*, 91:664-668

Frankel, A., D., Pabo C., O., (1998) Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 6:1189–1193

Green, M., Loewenstein, P.,M., (1988). "Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans-activator protein". *Cell* 55:1179–1188

Juks, C., Padari, K., Margus H., jt (2015) The role of endocytosis in the uptake and intracellular trafficking of PepFect14–nucleic acid nanocomplexes via class A scavenger receptors. *Biochim Biophys Acta* 18:3205–3216

Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., Prochiantz, A., (1991) Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Neurobiology*, 88:1864-1868

Kelley, J. L., Ozment, T. R., Li, C., Schweitzer J. B., & Williams, D. L., (2014) Scavenger Receptor-A (CD204): A Two-Edged Sword in Health and Disease. *Critical Reviews in Immunology*, 34:241–261

Kurrikoff, K., Gestin, M., Langel, Ü. (2015) Recent in vivo advances in cell-penetrating peptide-assisted drug delivery. *Expert opinion on drug delivery*, 2015

Lee, E.,S., Gao, Z., Kim, D., jt (2008) Super pH-sensitive multifunctional polymeric micelle for tumor pH specific TAT exposure and multidrug resistance. *J Control Release* 129:228–236.

Lehto, T., Simonson, O., E., Mäger, I., jt (2011) A peptide-based vector for efficient gene transfer *in Vitro* and *in Vivo*. *Molecular Therapy* 19:1457–1467

Li, J., Y., Paragas, N., Ned R., M., jt (2009) Scara5 is a ferritin receptor mediating non-transferrin iron delivery. *Developmental Cell* 16:35–46

Lindberg, S., Munoz-Alarcon, A., Helmfors H., jt (2013) PepFect15, a novel endosomolytic cell-penetrating peptide for oligonucleotide delivery via scavenger receptors. *International Journal of Pharmaceutics* 441:242– 247

Lindberg, S., Regberg, J., Eriksson, J. jt (2015) A convergent uptake route for peptide- and polymer-based nucleotide delivery systems. *J Control Release* 206:58–66

Lindgren, M., Hällbrink, M., Prochiantz, A., Langel, Ü., (2000) Cell-penetrating peptides. *Cell-Penetrating Peptides: Methods and Protocols*, Methods in Molecular Biology, vol. 683.

Lim J. P., Gleeson P. A., (2011) Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunology and Cell Biology* 89:836–843

Mayor, S., ja Pagano R., E., (2007) Pahtways of clathrin-independent endocytosis. *Net. Rev. Mol. Cell. Biol* 8:603-12

Margus, H., Arukuusk, P., Langel, Ü., Pooga, M., (2015) Characteristics of ell-penetrating peptide/nucleic acid nanoparticles. *Mol. Pharmaceutics* 13:172–179

Marsh, M., ja McMahon, H., T., (1999) The structural era of endocytosis. *Science* 285: 215-220

McMahon, H., T., Boucrot, E., (2011) Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews* 12:517-533

Means, T. K., (2010) Fungal pathogen recognition by scavenger receptors in nematodes and mammals. *Virulence* 1:37-41

Murphy, J. E., Tedbury, P. R., Homer-Vanniasinkam, S., jt (2005) Biochemistry and cell biology of mammalian scavenger receptors. *Atherosclerosis* 182:1–15

Mäe, M., Andaloussi, S., Lundin, P., jt (2009) A stearylated CPP for delivery of splice correcting oligonucleotides using a non-covalent co-incubation strategy. *J Control Release* 134:221–227

Myrberg, H., Zhang, L., L., Mäe, M., jt (2008) Design of a tumorhoming cell-penetrating peptide. *Bioconjug Chem* 19:70–75

Nagayamaa, S., Ogawara, K., Minato K., jt (2007) Fetuin mediates hepatic uptake of negatively charged nanoparticles via scavenger receptor. *International Journal of Pharmaceutics* 329:192–198

Ohtani, K., Suzuki, Y., Eda, S., jt (2001) The membrane-type collectin CL-P1 is a scavenger receptor on vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 276:44222–44228

Oskolkov, N., Arukuusk, P., Copolovici, D.-M., jt (2011) NickFects, phosphorylated derivatives of transportan 10 for cellular delivery of oligonucleotides. *Int J Pept Res Ther* 17:147–157

Otto, G., P., ja Nichols B., J., (2011) The roles of flottilin microdomains – endocytosis and beyond. *J Cell Sci* 124:3933-3940

Pooga, M., Soomets, U., Hällbrink, M., jt (1998) Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat Biotechnol.* 16:857–861

Prabhudas, M., Bowdish, D., Drickamer, K., jt (2014) Standardizing Scavenger Receptor Nomenclature. *J Immunol* 192:1997-2006

Rittner, K., Benavente, A., Bompard-Sorlet, A., jt (2002) New Basic Membrane-Destabilizing Peptides for Plasmid-Based Gene Delivery *in Vitro* and *in Vivo*. Molecular Therapy 5:104-114

Rousselle, C., Clair, P., Lefauconnier, J.-M., jt (2000) New advances in the transport of doxorubicin through the blood-brain barrier by a peptide vector-mediated strategy. Mol Pharm 57:679–686

Suhorutsenko, J., Oskolkov, N., Arukuusk, P., jt (2011) Cell-penetrating peptides, PepFects, show no evidence of toxicity and immunogenicity *in vitro* and *in vivo*. Bioconj Chem 22:2255–2262

Thomas, C., M., Smart, E. J. (2008) Caveolae structure and function. J. Cell. Mol. Med. 12:796-809

Turner, J., J., Arzumanov, A., A., Ivanova, G., Fabani, M., Gait M., J., (2007) Peptide conjugates of oligonucleotide analogs and siRNA for gene expression modulation. Handbook of Cell-Penetrating Peptides

Veiman, K.-L., Künnapuu, K., Lehto, T., jt (2015) PEG shielded MMP sensitive CPPs for efficient and tumor specific gene delivery *in vivo*. Journal of Controlled Release 209:238–247

Veiman K.-L., Mäger, I., Ezzat, K., jt (2013) PepFect14 peptide vector for efficient gene delivery in cell cultures. Mol Pharm. 10:199-210

B. Raamatud

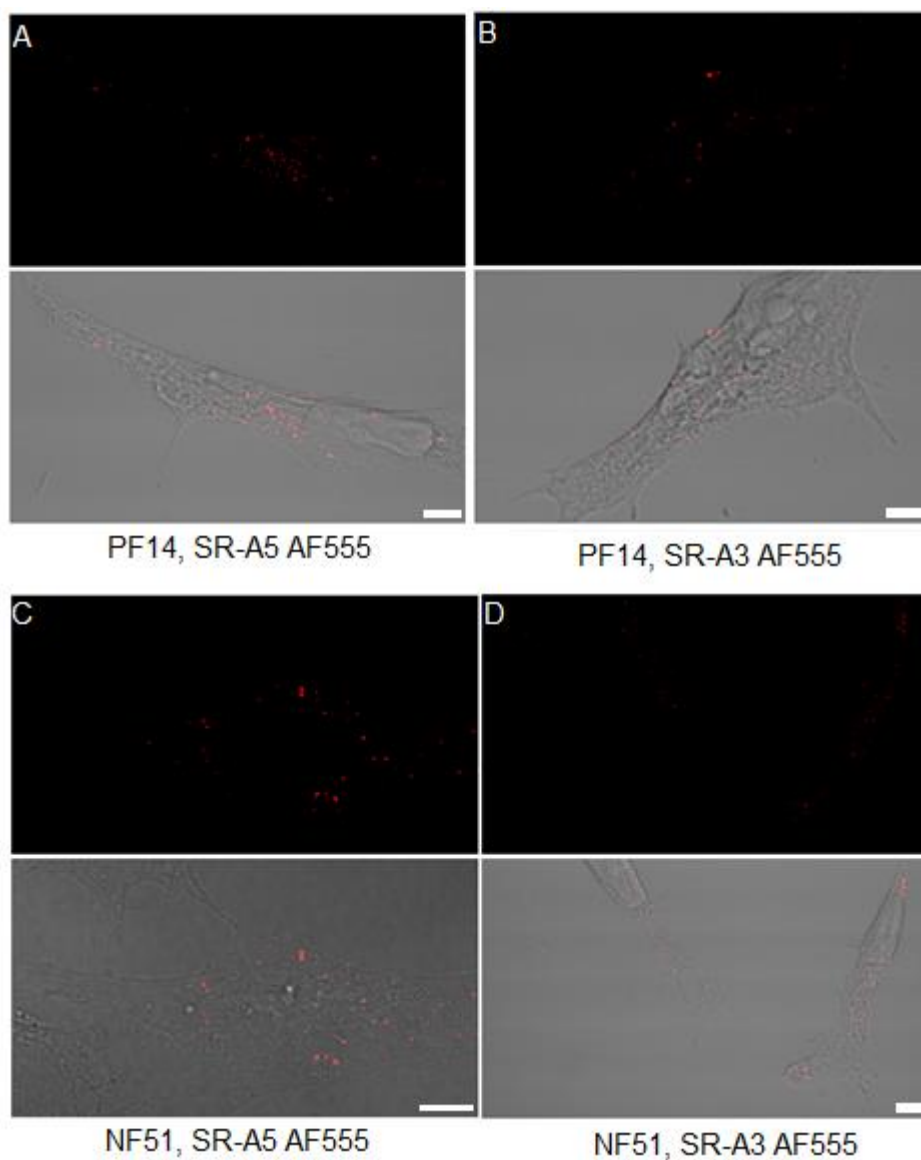
Langel, Ü., (2011) Cell penetrating peptides. Methods and Protocols. Humana Press.

C. Interneti leheküljed

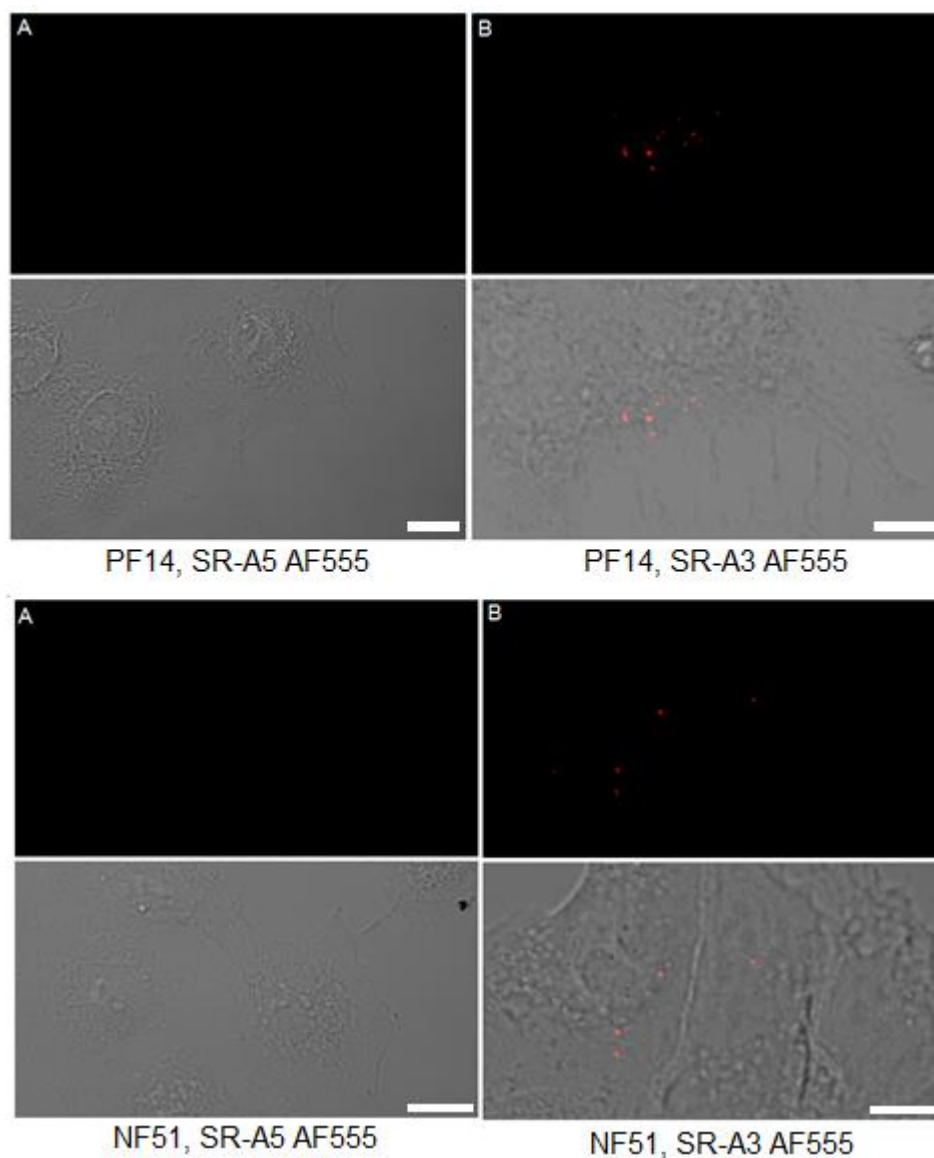
RSP and mebaas CPPsite 2.0 - <http://www.imtech.res.in/raghava/cppsite/index.html>

LISAD

Lisa 1

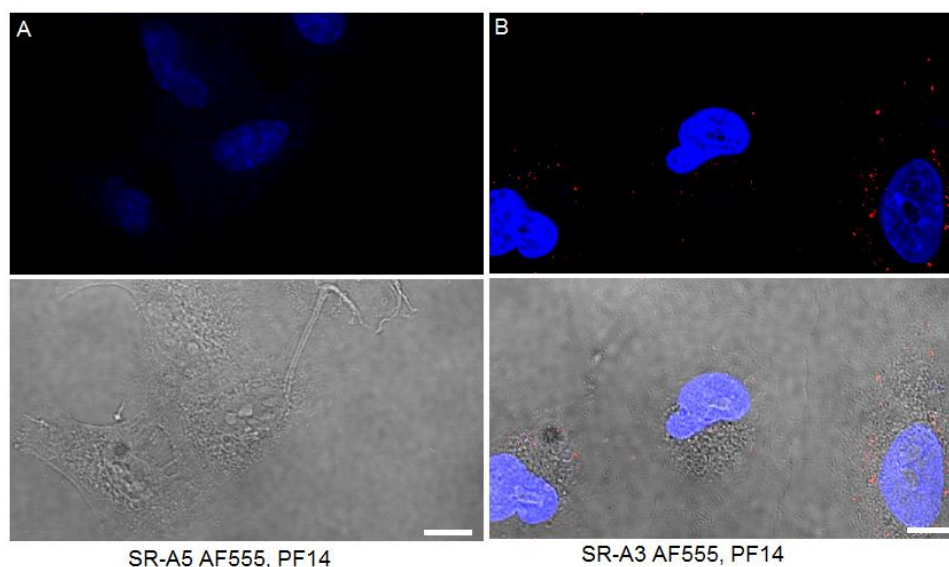


Lisajoonis 1. Püüduretseptorite SR-A5 ja SR-A3 paiknemine HeLa rakkude pinnal. A. SR-A5 retseptorite tuvastamine rakkude pinnale vastava SR-A5 primaarse ja sekundaarse antikehadega pärast inkubatsiooni 1 μ M PF14 sisaldavas koekultuuri söötmes. B. SR-A3 retseptorid tuvastatuna SR-A3 antikehadega pärast inkubatsiooni 1 μ M PF14 sisaldavas rakusöötmes. C. SR-A5 retseptorite paiknemine pinnal detekteerituna vastavate antikehadega pärast inkubatsiooni 1 μ M NF51 sisaldavas söötmes. D. SR-A3 retseptorite tuvastamie SR-A3 primaarse ja sekundaarse antikehadega pärast inkubatsiooni 1 μ M NF51 sisaldavas koekultuuri söötmes. Sekundaarsed antikehad on märgistatud AlexaFluor 555-ga. Mõõtlõik on 10 μ m



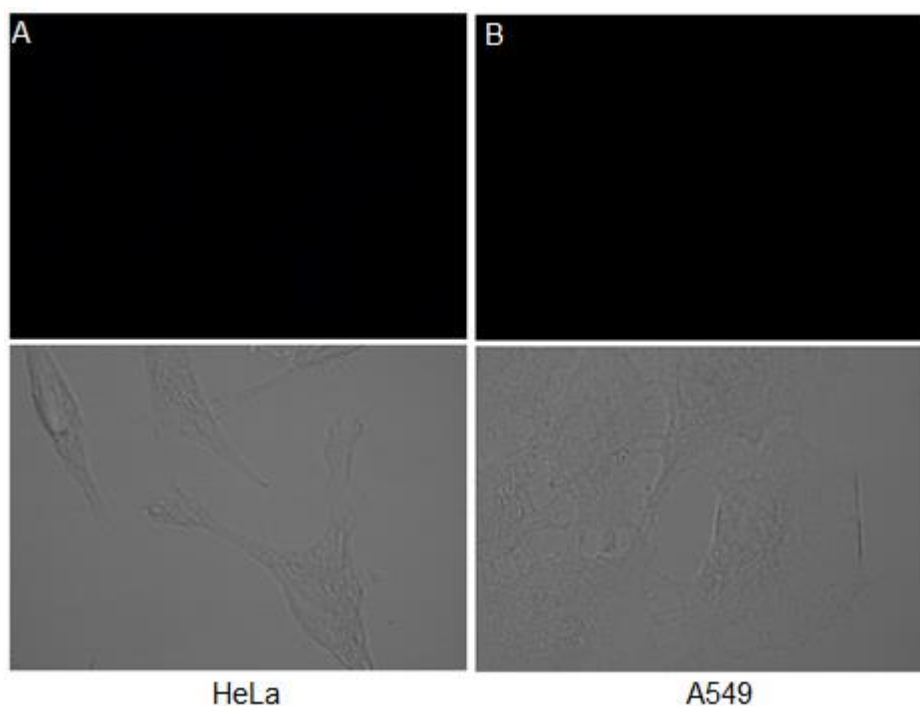
Lisajoonis 2. Püüduretseptorite SR-A5 ja SR-A3 detekteerimine A549 rakkude pinnal. A. SR-A5 retseptorite tuvastamine rakkude pinnale vastava primaarse ja sekundaarse antikehadega pärast inkubatsiooni 1 μ M PF14 sisaldavas koekultuuri söötmes. B. SR-A3 retseptorid tuvastatuna SR-A3 antikehadega pärast inkubatsiooni 1 μ M PF14 sisaldavas rakusöötmes. C. SR-A5 retseptorite paiknemine pinnal detekteerituna vastavate antikehadega pärast inkubatsiooni 1 μ M NF51 sisaldavas söötmes. D. SR-A3 retseptorite tuvastamie SR-A3 primaarse ja sekundaarse antikehadega pärast inkubatsiooni 1 μ M NF51 sisaldavas koekultuuri söötmes. Sekundaarsed antikehad on märgistatud AlexaFluor 555-ga. Mõõtlõik on 10 μ m

Lisa 3



Lisajoonis 3. Positiivne kontroll SR-A retseptorite tuvastamiseks A549 rakkudes. A. SR-A5 retseptorite detekteerimine permeabiliseeritud rakkudes SCARA5 primaarsete ja vastavate sekundaarsete antikehadega pärast inkubeerimist 1 μ M PF14 sisaldavas koekultuuri söötmes. B. SR-A3 retseptorite tuvastamine SCARA3 primaarse ja sekundaarse antikehadega pärast inkubeerimist 1 μ M PF14 peptiidi juuresolekul näitas, et A549 omab SR-A3 retseptoreid. Sekundaarsed antikehad on märgistatud AlexaFluor 555-ga, DAPI kasutatud tuuma märgisena. Permeabiliseerimine on tehtud metanooliga. Mõõtlõik on 10 μ m

Lisa 4



Lisajoonis 4. Tühi kontroll. A. HeLa rakud ilma komplekside lisadeta. B. A549 rakud ilma komplekside lisadeta.

LIHTLITSENS

Mina, _____ **Victor Blokhin** _____

(*autori nimi*)

(sünnikuupäev: _____ **26.09.1988** _____)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose:

**SR-A retseptorite regulatsioon pDNA transpordil PF ja NF tüüpi
transfektsioonipeptiididega,
(lõputöö pealkiri)**

mille juhendaja on: prof. Margus Pooga, Ph.D Helerin Margus,

(*juhendaja nimi*)

- 1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- 1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **25.08.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.
2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartu, 18.08.2016 (*kuupäev*)